



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) **EP 1 043 399 A2**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
11.10.2000 Patentblatt 2000/41

(21) Anmeldenummer: **00105929.4**

(22) Anmeldetag: **23.03.2000**

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/86**, C12N 7/01,
C12N 7/04, C12N 5/10,
C07K 14/18, A61K 49/00,
A61K 48/00

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **03.04.1999 DE 19915178**

(71) Anmelder:
Bartenschlager, Ralf, Dr.
55239 Gau-Odernheim (DE)

(72) Erfinder:
Bartenschlager, Ralf, Dr.
55239 Gau-Odernheim (DE)

(74) Vertreter: **Rudolph, Ulrike, Dr.**
Patentanwältin
In der Schanz 10
69198 Schriesheim (DE)

(54) **Hepatitis C Virus Zellkultursystem**

(57) Das erfindungsgemäße Hepatitis C Virus (HCV) Zellkultursystem besteht aus humanen Hepato-mazellen, die mit einem HCV-RNA-Konstrukt transfi-ziert sind, das die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zudem wenigstens ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt.

EP 1 043 399 A2

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Hepatitis C Virus (HCV) Zellkultursystem, das im wesentlichen eukaryontische Zellen umfaßt, die eingeschleustes HCV-spezifisches Genmaterial enthalten, d.h. die mit HCV-spezifischem Genmaterial transfiziert sind.

[0002] Das Hepatitis C Virus (HCV) ist eine der Hauptursachen chronischer und sporadischer Leberkrankungen weltweit. Die meisten HCV-Infektionen verlaufen ohne erkennbare klinische Symptome, allerdings werden 80-90% der Infizierten dauerhafte Virusträger und bei 50% dieser dauerhaften Virusträger kommt es zu einer chronischen Leberentzündung mit unterschiedlichen Schweregraden. Ca. 20% der chronisch Infizierten entwickeln im Laufe von 10 bis 20 Jahren eine Leberzirrhose, auf deren Basis sich ein primäres Leberzellkarzinom entwickeln kann. Die chronische Hepatitis C ist heute die Hauptindikation für eine Lebertransplantation. Eine Kausaltherapie gibt es bisher noch nicht. Die einzige derzeit verfügbare Therapie ist die hochdosierte Verabreichung von Interferon-Alpha oder eine Kombination aus Interferon-Alpha und dem Purin-Nukleosidanalogon Ribavirin. Allerdings sprechen nur ca. 60 % aller Behandelten auf diese Therapie an und bei diesen kommt es in mehr als der Hälfte aller Fälle nach dem Absetzen der Behandlung zu einer erneuten Virämie.

Aufgrund der hohen Prävalenz, gerade auch in den Industrieländern, den schwerwiegenden Folgen chronischer Infektionen und dem Fehlen einer Kausaltherapie ist die Entwicklung einer HCV-spezifischen Chemotherapie ein wesentliches Ziel der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Hauptproblem hierbei ist bisher das Fehlen eines geeigneten Zellkultursystems, das ein Studium der Virus-Replikation und der Pathogenese in eukaryontischen Zellen ermöglicht.

[0003] Aufgrund der geringen Virusmengen im Blut bzw. Gewebe, dem Fehlen geeigneter Zellkultursysteme oder Tiermodelle (bis heute ist der Schimpanse das einzige mögliche Versuchstier) sowie dem Fehlen effizienter Systeme zur Produktion virus-ähnlicher Partikel, konnte die molekulare Zusammensetzung des HCV-Partikels bis heute noch nicht eingehend untersucht bzw. aufgeklärt werden. Die derzeit vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Das HCV ist ein umhülltes Plusstrang RNA Virus mit einem Partikeldurchmesser von 50-60 nm und einer mittleren Dichte von 1,03-1,1g/ml. Es wurde erstmals 1989 molekular kloniert und charakterisiert (Choo et al., 1989: Science, 244, 359-362). Die HCV-RNA hat eine Länge von ca. 9.6 kb (= 9600 Nukleotide), eine positive Polarität und besitzt ein einziges offenes Leseraster (ORF = open reading frame), das ein lineares Polyprotein von ca 3010 Aminosäuren kodiert (siehe Rice 1996, in Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996), vol. 1, pp.931-960; Clarke 1997, J. Gen. Virol. 78, 2397; und Bartenschlager 1997, Intervirology 40, 378 und vgl. Fig. 1 A). Bei der Virusreplikation wird das Polyprotein durch zelluläre und virale Proteasen in die reifen und funktionell aktiven Proteine gespalten.

Innerhalb des Polyproteins sind die Proteine wie folgt angeordnet (vom Amino- zum Carboxyterminus): Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Das Core-Protein ist die Hauptkomponente des Nukleokapsids. Die Glykoproteine E1 und E2 sind Transmembranproteine und Hauptkomponenten der Virushülle. Sie spielen wahrscheinlich bei der Anheftung des Virus an die Wirtszelle eine wesentliche Rolle. Diese drei Proteine Core, E1 und E2 bauen den Viruspartikel auf und werden deshalb als Strukturproteine bezeichnet. Die Funktion des Proteins p7 ist noch unklar. Das Protein NS2 ist wahrscheinlich die katalytische Domäne der NS2-3 Protease, die für die Prozessierung zwischen den Proteinen NS2 und NS3 verantwortlich ist. Das Protein NS3 hat zwei Funktionen, nämlich in der aminoterminalen Domäne eine Proteaseaktivität, die für die Polyproteinprozessierung essentiell ist, und in der carboxyterminalen Domäne eine NTPase/Helikase-Funktion, die wahrscheinlich bei der Replikation der viralen RNA eine Rolle spielt. Das Protein NS4A ist ein Kofaktor der NS3-Protease. Die Funktion des Proteins NS4B ist unbekannt.

[0004] Das offene Leseraster ist an seinem 5' Ende von einer ca 340 Nukleotide langen nicht-translatierten Region (NTR = non-translated region) flankiert, die als interne Ribosomenansatzstelle (IRES = internal ribosome entry site) fungiert, und an seinem 3' Ende von einer ca. 230 Nukleotide langen NTR, die höchstwahrscheinlich für die Genomreplikation von Bedeutung ist. Eine solche 3' NTR ist Gegenstand der Patentanmeldung PCT/US 96/14033. Die Strukturproteine in dem amino-terminalen Viertel des Polyproteins werden von der Signalpeptidase der Wirtszelle gespalten. Die Nicht-Strukturproteine (NS) 2 bis (NS) 5B werden von zwei viralen Enzymen prozessiert, nämlich von der NS2-3 und der NS3/4A Proteinase. Die NS3/4A Proteinase wird für alle Spaltungen jenseits des Carboxyterminus von NS3 benötigt. Die Rolle von NS4B ist nicht bekannt. NS5A, ein hoch phosphoryliertes Protein, scheint für die Interferon Resistenz verschiedener HCV-Genotypen verantwortlich zu sein (vgl. Enomoto et al. 1995, J. Clin. Invest. 96, 224; Enomoto et al. 1996, N. Engl. J. Med. 334, 77; Gale Jr. et al. 1997, Virology 230, 217; Kaneko et al. 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 320; Reed et al., 1997, J. Virol. 71, 7187) und NS5B wurde als die RNA-abhängige RNA Polymerase identifiziert.

[0005] Anhand dieser Erkenntnisse wurden erste Diagnosesysteme entwickelt, die entweder auf dem Nachweis von HCV-spezifischen Antikörpern in Patientenserum oder auf dem Nachweis von HCV-spezifischer RNA mittels RT-PCR (= Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) beruhen, und die mittlerweile routine- und/oder vorschrittmäßig bei allen Blutkonserven angewendet werden (müssen).

[0006] Seit der Erstbeschreibung des Genoms 1989 wurden mit Hilfe der PCR-Methode zahlreiche Teil- und Kompletsequenzen des HCV kloniert und charakterisiert. Ein Vergleich dieser Sequenzen zeigt eine hohe Variabilität des viralen Genoms, insbesondere im Bereich des NS5B-Gens, was letztendlich zu einer Einteilung in 6 Genotypen geführt hat, die selbst nochmals in Subtypen a, b, und c untergliedert sind. Die genomische Varianz ist nicht gleichmäßig über das Genom verteilt. So sind die 5'NTR und Teile der 3'NTR hoch konserviert, während bestimmte kodierende Sequenzen z.T. sehr stark variieren, vor allem die Hüllproteine E1 und E2.

[0007] Die klonierten und charakterisierten Teil- und Kompletsequenzen des HCV-Genoms wurden außerdem hinsichtlich geeigneter Angriffsziele für ein prospektives antivirales Therapeutikum untersucht. Dabei wurden drei virale Enzyme gefunden, die sich als solches Angriffsziel anbieten. Diese sind (1) der NS3/4A Proteasekomplex, (2) die NS3 Helikase und (3) die NS5B RNA-abhängige RNA Polymerase. Der NS3/4A Proteasekomplex und die NS3 Helikase konnten bereits kristallisiert und hinsichtlich ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärt werden (Kim et al., 1996, Cell, 87,343; Yem et al., 1998, Protein Science, 7, 837; Love et al., 1996, Cell, 87, 311; Kim et al., 1998, Structure, 6, 89; Yao et al., 1997, Nature Structural Biology, 4, 463, Cho et al., 1998, J. Biol. Chem., 273, 15045); bei der NS5B RNA-abhängigen RNA Polymerase ist dies bis heute noch nicht gelungen.

Obwohl mit diesen Enzymen bedeutsame Angriffsziele für eine Therapieentwicklung der chronischen HCV-Infektion definiert sind, und obwohl sowohl mit Hilfe von 'rational drug design' als auch mit Hilfe von 'high throughput screens' weltweit intensiv nach geeigneten Inhibitoren gesucht wird, leidet die Therapieentwicklung an einem großen Defizit, nämlich dem Fehlen von Zellkultursystemen oder einfachen Tiermodellen, die es erlauben, HCV-RNA oder HCV-Antigene direkt, zuverlässig und mit einfachen laborüblichen Methoden nachzuweisen. Das Fehlen solcher Zellkultursysteme ist auch der Hauptgrund dafür, daß das Verständnis der HCV-Replikation bis heute noch sehr lückenhaft und in weiten Teilen nur hypothetisch ist.

[0008] Obwohl nach Meinung der Fachwelt eine enge evolutionäre Beziehung zwischen HCV und den Flavi- und Pestiviren besteht und für diese autonom replizierende RNAs beschrieben sind, die in verschiedenen Zelllinien ohne weiteres zur Replikation gebracht werden können und dabei relativ hohe Ausbeuten zeigen (siehe Khromykh et al., 1997, J. Virol. 71, 1497; Behrens et al., 1998, J. Virol. 72, 2364; Moser et al., 1998, J. Virol. 72, 5318), waren ähnliche Versuche mit HCV bisher nicht erfolgreich.

[0009] Zwar ist aus verschiedenen Publikationen bekannt, daß Zelllinien oder primäre Zellkulturen mit HCV-haltigem, hochtitrigem Patientenserum infiziert werden können, (Lanford et al. 1994, Virology 202, 606; Shimizu et al. 1993, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90, 6037-6041; Mizutani et al. 1996, Journal of Virology, 70, 7219-7223; M. Ikeda et al. 1998, Virus Res. 56, 157; Fournier et al. 1998, J. Gen. Virol. 79, 2376 und darin zitierte Literaturstellen, Ito et al. 1996, Journal of General Virology, 77, 1043-1054), diese virusinfizierten Zelllinien oder Zellkulturen erlauben jedoch nicht den direkten Nachweis von HCV-RNA oder HCV-Antigenen. Die virale RNA in diesen Zellen ist weder in einem Northern-Blot (einem Standardverfahren zum quantitativen Nachweis von RNA) noch sind die viralen Proteine in einem Western-Blot oder mittels Immunpräzipitation detektierbar. Nur mit sehr aufwendigen und indirekten Methoden ist es überhaupt gelungen, eine HCV-Replikation nachzuweisen. Diese nachteiligen Umstände zeigen klar, daß die Replikation in diesen bekannten virusinfizierten Zelllinien oder Zellkulturen absolut unzureichend ist.

[0010] Desweiteren ist aus den Publikationen von Yoo et al. (1995, Journal of Virology, 69, 32-38) und von Dash et al., (1997, American Journal of Pathology, 151, 363-373) bekannt, daß Hepatomazelllinien mit synthetischer HCV-RNA, die mittels in vitro Transkription von kloniertem HCV-Genom gewonnen wurde, transfiziert werden können. In beiden Publikationen gingen die Autoren von dem Grundgedanken aus, daß das virale HCV-Genom eine Plusstrang-RNA ist, die nach dem Einschleusen in die Zelle direkt als mRNA fungiert, an die sich Ribosomen anheften und im Zuge von Translationsprozessen Virusproteine bilden, aus denen sich letztendlich neue HCV-Partikel bilden (können). Diese Virusreplikation, d.h. diese neu gebildeten HCV-Viren bzw. deren RNA wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Die publizierten Ergebnisse der durchgeführten RT-PCR sprechen jedoch dafür, daß die Effizienz der HCV-Replikation in den beschriebenen HCV-transfizierten Hepatomazellen nur sehr gering ist und jedenfalls nicht ausreicht, um Schwankungen in der Replikationsrate nach gezielter Einwirkung mit prospektiven antiviralen Therapeutika auch nur qualitativ, geschweige denn quantitativ zu messen. Außerdem ist im Stand der Technik mittlerweile bekannt (Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2291-95, 1999), daß die hochkonservierte 3' NTR essentiell ist für die Virusreplikation, was in klarem Widerspruch zu den Behauptungen von Yoo et al. und Dash et al. steht, die für ihre Versuche in Unkenntnis des authentischen 3' Endes des HCV-Genoms ausschließlich HCV-Genome mit verkürzten 3' NTRs verwendet haben.

[0011] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines HCV- Zellkultursystems, bei dem die virale RNA in den transfizierten Zellen autonom und mit so hoher Effizienz repliziert, daß Schwankungen in der Replikationsrate nach gezielter Einwirkung mit virus- und insbesondere HCV-spezifischen prospektiven antiviralen Therapeutika qualitativ und quantitativ und mit Hilfe gängiger, laborüblicher Meßverfahren gemessen werden können.

[0012] Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Zellkultursystems der eingangs genannten Art, bei dem die eukaryontischen Zellen humane Zellen, insbesondere Hepatomazellen sind, die vorzugsweise von einer handelsüblichen Hepatomazelllinie abstammen, aber auch aus einer entsprechenden Primärzellkultur gewonnen sein können, und bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt ist, das im

wesentlichen die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR, vorzugsweise in der genannten Reihenfolge, und zudem wenigstens ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt. "NTR" steht hier und im folgenden für "nicht-translatierte Region" und ist dem einschlägigen Fachmann als Begriff bzw. Abkürzung bekannt und geläufig. Der Begriff "HCV-RNA-Konstrukt" umfaßt hier und im folgenden sowohl Konstrukte, die das komplette HCV-Genom enthalten, als auch solche, die lediglich einen Teil davon, d.h. ein HCV-Subgenom enthalten.

Eine bevorzugte Variante des erfindungsgemäßen Zellkultursystems, die sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, ist unter der Nummer DSM ACC2394 (Laborbezeichnung HuBI 9-13) bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, Deutschland, hinterlegt.

[0013] Mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem wird erstmals ein in-vitro-System bereit gestellt, in dem HCV-RNA intrazellulär, autonom und in ausreichend großen Mengen repliziert und exprimiert wird, so daß eine quantitative Bestimmung sowohl der HCV-RNA-Mengen als auch der HCV-spezifischen Proteine mit konventionellen und zuverlässig genauen biochemischen Meßmethoden durchgeführt werden kann. Das heißt: es steht erstmals ein annähernd authentisches zellgestütztes ("cell-based") HCV-Replikationssystem zur Verfügung, das für die Entwicklung und Erprobung von antiviralen Pharmazeutika dringend benötigt wird. Dieses Testsystem bietet nun die Möglichkeit, potentielle Angriffsziele für eine wirksame HCV-spezifische Therapie zu identifizieren und HCV-spezifische Chemotherapeutika zu entwickeln und zu evaluieren.

[0014] Die Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, daß eine effiziente Replikation der HCV-RNA nur dann in Zellen stattfindet, wenn diese mit einem HCV-RNA-Konstrukt transfiziert wurden, das mindestens die 5' und die 3' nicht-translatierten Regionen (NTR) und die Nichtstrukturproteine (NS) 3 bis 5B umfaßt und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) aufweist. Offensichtlich sind die Strukturgene für den Ablauf der Replikation ohne wesentliche Bedeutung, während andererseits eine effiziente Replikation der HCV-RNA anscheinend nur dann stattfindet, wenn die transfizierten Zellen einem permanenten Selektionsdruck unterzogen werden, der durch das mit der HCV-RNA verbundene selektierbare Markergen (Selektionsgen) vermittelt wird. Das Markergen (Selektionsgen) scheint somit einerseits die Selektion derjenigen Zellen zu provozieren, in denen die HCV-RNA produktiv repliziert, und andererseits scheint es die Effizienz der RNA-Replikation wesentlich zu steigern.

[0015] Gegenstand der Erfindung ist auch ein zellfreies HCV-RNA-Konstrukt, das sich dadurch auszeichnet, daß es die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR, vorzugsweise in der genannten Reihenfolge, und zudem ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt.

[0016] Der Begriff 5' NTR bzw. NS3 bzw. NS4A bzw. NS4B bzw. NS5A bzw. NS5B bzw. 3' NTR umfaßt im vorliegenden Zusammenhang jede Nukleotidsequenz, die im Stand der Technik als Nukleotidsequenz für den jeweils betreffenden funktionellen Abschnitt des HCV-Genoms beschrieben ist.

[0017] Die Bereitstellung eines solchen HCV-RNA-Konstrukts ermöglicht erstmals eine detaillierte Analyse der HCV - Replikation, - Pathogenese und - Evolution in Zellkulturen. Die HCV-spezifische virale RNA kann - als vollständiges Genom oder als Subgenom - gezielt in beliebigen Mengen erzeugt werden, und es besteht die Möglichkeit, das RNA-Konstrukt zu manipulieren und damit die HCV-Funktionen auf genetischer Ebene zu untersuchen und aufzuklären.

[0018] Da alle zur Zeit als Hauptangriffsziel für eine Therapie untersuchten HCV-Enzyme, nämlich die NS3/4A Protease, die NS3 Helikase und die NS5B Polymerase, in dem erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukt enthalten sind, kann es für alle entsprechenden Untersuchungen benutzt werden.

[0019] Eine Ausführungsform des HCV-RNA-Konstrukts, die sich in der praktischen Anwendung sehr gut bewährt hat, zeichnet sich dadurch aus, daß sie die Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 umfaßt.

Weitere Ausführungsvarianten mit vergleichbar guten Eigenschaften für den Einsatz in der Praxis sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleotidsequenz entweder gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:6 oder SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:9 oder SEQ ID NO:10 oder SEQ ID NO:11 umfassen.

[0020] Es besteht die Möglichkeit, das erfindungsgemäße HCV-Subgenom-Konstrukt mit einer 3' NTR zu versehen, die eine im Stand der Technik hierfür bisher unbekannte Nukleotidsequenz aufweist, nämlich eine Nukleotidsequenz, die aus der Gruppe der nachfolgend aufgelisteten Nukleotidsequenzen (a) bis (i) ausgewählt ist:

(a) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTTTTA
GCTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTGTAGAGAGAGAGTCTCACTCTGTTGCCC
AGACTGGAGT

(b) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GGAGC

(c) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTAATCTTT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GCAGC

(d) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTTAGTC TTTTTTTTTT TCTTTTTTTT TGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(e) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TCTTTTTTTT TGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(f) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TCTTTTTTTT TTGAGAGAGA GAGTCTCACT
CTGTTGCCCA GACTGGAGT

(g) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT GAGAGAGAGA
GTCTCACTCT GTTGCCAGAGA CTGGAGT

(h) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTTT TTTTCCTTT TTTTGAGAGA
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T

(i) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAATC TTTTTTTTTT TTTCTTTTT TTTTGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

Das in den erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukten enthaltene selektierbare Markergen (Selektionsgen) ist vorzugsweise ein Resistenzgen, insbesondere eine Antibiotikumresistenzgen.

Das hat den Vorteil, daß die mit diesem Konstrukt transfizierten Zellen leicht von den nicht transfizierten Zellen selektiert werden können, indem dem Zellkulturmedium z.B. im Fall eines Antibiotikumresistenzgens das betreffende Antibiotikum zugegeben wird. Unter 'Antibiotikum' wird im vorliegenden Zusammenhang jede Substanz verstanden, die die nicht-transfizierten Wirtszellen oder die Zellen, in denen die HCV-RNA nur mit geringer Effizienz repliziert, am Leben oder Wachstum hindert, insbesondere Zellgifte wie z.B. Puromycin, Hygromycin, Zeocin, Bleomycin oder Blasticidin.

[0021] Ein bevorzugtes selektierbares Markergen (Selektionsgen) bzw. Resistenzgen, das sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, ist das Neomycinphosphotransferasegen.

[0022] Eine Alternative zu den Antibiotikumresistenzgenen ist z.B. das Thymidin-Kinase-Gen, mit dem eine HAT-

Selektion durchgeführt werden kann.

[0023] Die Position des selektierbaren Markergens (Selektionsgens), bzw. des bevorzugten Resistenzgens bzw. des besonders bevorzugten Antibiotikumresistenzgens in dem HCV-RNA-Konstrukt liegt vorzugsweise hinter der HCV 5' NTR, d.h. strangabwärts der 5' NTR bzw. strangaufwärts des HCV-Leserasters. Denkbar ist aber auch eine Insertion im Bereich der 3' NTR oder an anderer Stelle des HCV-Genoms oder -Subgenoms, z.B. innerhalb des Polyproteins.

[0024] Bei einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts ist das selektierbare Markergen (Selektionsgen), insbesondere ein Antibiotikumresistenzgen, über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA bzw. der HCV-Genom- oder -Subgenomsequenz verbunden.

[0025] Damit geht der Vorteil einher, daß nach erfolgter Selektion derjenigen Zellen, in denen die HCV-RNA produktiv repliziert, in den daraus gewonnenen Zellklonen das Resistenzgen durch ribozymvermittelte Spaltung von der HCV-Subgenomsequenz abgetrennt werden kann, nämlich durch Aktivierung des einklonierten Ribozyms oder, im Fall eines Konstrukts mit einer Erkennungsstelle für ein Ribozym, durch Einschleusen des Ribozyms in die Zellen (z.B. mittels Transfektion eines Ribozymkonstrukts oder Infektion mit einem viralen Expressionsvektor, in den das entsprechende Ribozym eingesetzt wurde). Auf diese Weise wird ein authentisches HCV-Genom-Konstrukt ohne Resistenzgen erhalten, das zur Bildung authentischer infektiöser Viruspartikel befähigt ist.

[0026] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts zeichnet sich dadurch aus, daß das Konstrukt wenigstens ein integriertes Reportergen aufweist.

[0027] Unter Reportergen wird im folgenden jedes Gen verstanden, dessen Anwesenheit sich nach Überführung in einen Zielorganismus leicht und im allgemeinen mit einfachen biochemischen oder auch histochemischen Methoden nachweisen läßt, d.h. das für ein Protein kodiert, welches auch in geringen Mengen einfach und zuverlässig mit den laborüblichen Meßmethoden nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

[0028] Diese Variante des HCV-RNA-Konstrukts hat den Vorteil, daß der Umfang der Replikation dieses Konstrukts anhand des Reportergenprodukts einfach und schnell mit laborüblichen Methoden gemessen werden kann.

[0029] Das Reportergen ist vorzugsweise ein Gen aus der Gruppe der Luziferasegene, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasegen), dem GFP-Gen (green-fluorescence-protein-Gen), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) oder dem SEAP-Gen (Sezernierte-Alkalische-Phosphatase-Gen). Diese Reportergene bzw. deren Produkte, nämlich die entsprechenden Reporterproteine, können z.B. mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, colorimetrisch oder mit Hilfe immunologischer Methoden (z.B. ELISA) bestimmt werden.

[0030] Als Reportergen kommt aber auch ein Surrogatmarkergen in Betracht. Darunter sind in diesem Zusammenhang solche Gene zu verstehen, die für zelluläre Proteine, Nukleinsäuren oder — allgemein — für solche Funktionen kodieren, die einer von der Virusreplikation abhängigen Variation unterliegen, und die infolgedessen in denjenigen Zellen, in denen sich das HCV bzw. das HCV-RNA-Konstrukt vermehrt, entweder reprimiert oder aktiviert werden. Das heißt: die Reduktion bzw. Aktivierung dieser Funktion ist ein Ersatzmarker für die Virusreplikation bzw. die Replikation des HCV-RNA-Konstrukts.

[0031] Die Positionen von Reportergen und selektierbarem Markergen (Selektionsgen) können so gewählt sein, daß ein aus den beiden Genprodukten gebildetes Fusionsprotein exprimiert wird. Hierbei besteht die vorteilhafte Möglichkeit, daß diese beiden Gene so in dem HCV-RNA-Konstrukt angeordnet sind, daß ihre beiden exprimierten Proteine zunächst über eine Schnittstelle für eine Protease (z.B. Ubiquitin) oder über ein selbstspaltendes Peptid (z.B. das 2A-Protein der Picornaviren) fusioniert sind und erst später proteolytisch wieder getrennt werden.

Ebensogut können diese beiden Positionen aber auch derart getrennt voneinander liegen, daß beide Genprodukte separat exprimiert werden. (z.B. in der Reihenfolge: Marker- bzw. Resistenzgen — interne Ribosomenbindungsstelle — Reportergen).

Im Fall des Reportergens hat sich eine Ausführungsvariante besonders bewährt, bei der das Reportergen in das offene Leseraster des HCV-Genoms oder -Subgenoms einkloniert ist, und zwar derart, daß es erst nach einer proteolytischen Prozessierung in eine aktive Form überführt wird.

[0032] Das erfindungsgemäße Zellkultursystem in allen seinen Variationen kann für vielfältige Zwecke eingesetzt werden. Diese umfassen:

- Das Auffinden antiviral wirksamer Substanzen. Dies können beispielsweise sein: organische Verbindungen, die unmittelbar oder mittelbar in die Virusvermehrung eingreifen (z.B. Inhibitoren der viralen Proteasen, der NS3-Helikase, der NS5B RNA-abhängigen RNA Polymerase), antisense Oligonukleotide, die an eine beliebige Zielsequenz innerhalb des HCV-RNA-Konstrukts (z.B. die 5' NTR) hybridisieren und unmittelbar oder mittelbar zu einer Beeinflussung der Virusvermehrung führen z.B. auf Grund einer Reduktion der Translation des HCV-Polyproteins oder Ribozyme, die eine beliebige HCV-RNA-Sequenz spalten und damit die Virusreplikation beeinträchtigen.
- Die Evaluierung jeglicher Art antiviral wirksamer Substanzen in Zellkultur. Solche Substanzen können beispielsweise mittels 'rational drug design' oder 'high-throughput screening' am isolierten gereinigten Enzym gefunden werden. Unter Evaluierung sind vor allem die Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften der entsprechenden Substanz sowie deren Wirkungsmechanismus zu verstehen.

- Die Identifikation neuer Angriffsziele, viralen oder zellulären Ursprungs, für eine HCV-spezifische antivirale Therapie. Ist beispielsweise ein zelluläres Protein essentiell für die Virusreplikation, kann mittels Hemmung dieses zellulären Proteins die Virusreplikation ebenfalls beeinflusst werden. Das Auffinden solcher auxiliären Faktoren ist mit dem erfindungsgemäßen System ebenfalls möglich.
- Der Einsatz für die Resistenzbestimmung. Es ist anzunehmen, daß auf Grund der hohen Mutationsrate des HCV-Genoms Therapieresistenzen auftreten. Solche Resistenzen, die gerade bei der klinischen Zulassung einer Substanz von großer Bedeutung sind, lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem ermitteln. Zelllinien in denen sich das HCV-RNA-Konstrukt bzw. das HCV-Genom oder - Subgenom repliziert, werden mit steigenden Konzentrationen der entsprechenden Substanz inkubiert und die Replikation der viralen RNA wird entweder anhand eines eingebrachten Reporters oder durch qualitative oder quantitative Bestimmung der viralen Nukleinsäuren oder Proteine bestimmt. Resistenz ist dann gegeben, wenn bei normaler Wirkstoffkonzentration keine Hemmung der Replikation zu beobachten ist. Durch Reklonierung der HCV-RNA (z.B. mittels RT-PCR) und Sequenzanalyse können die für Therapieresistenz verantwortlichen Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche ermittelt werden. Durch Einklonieren der/des entsprechenden Austausch/s in das Ursprungs-konstrukt kann deren Kausalität für die Therapieresistenz bewiesen werden.
- Die Produktion von authentischen Virusproteinen (Antigene) für die Entwicklung und/oder Evaluierung von Diagnostika. Das erfindungsgemäße Zellkultursystem erlaubt auch die Expression von HCV-Antigenen in Zellkulturen. Diese Antigene können prinzipiell auch für den Aufbau diagnostischer Nachweisverfahren eingesetzt werden.
- Die Produktion von HCV Viren und virus-ähnlichen Partikeln insbesondere zur Entwicklung oder Herstellung von Therapeutika und Impfstoffen sowie für diagnostische Zwecke. Insbesondere zellkultur-adaptierte vollständige HCV-Genome, die mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem hergestellt werden können, sind in der Lage, mit hoher Effizienz in Zellkulturen zu replizieren. Diese Genome besitzen alle Funktionen des HCV und sind deshalb in der Lage infektiöse Viren zu produzieren.

[0033] Das erfindungsgemäße HCV-RNA-Konstrukt für sich genommen kann in allen seinen Variationen ebenfalls für vielfältige Zwecke eingesetzt werden. Dazu gehören vor allem:

- Die Konstruktion attenuierter Hepatitis C Viren bzw. HCV-ähnlicher Partikel und deren Produktion in Zellkulturen: Durch zufällige oder gezielt hervorgerufene Mutationen, beispielsweise Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen, können attenuierte HCV- oder HCV-ähnliche Partikel erzeugt werden, d.h. Viren bzw. virusähnliche Partikel mit voller Replikationskompetenz aber verringerter bzw. fehlender Pathogenität. Solche attenuierte HCV- oder HCV-ähnliche Partikel sind insbesondere als Impfstoff einsetzbar.
- Die Konstruktion von HCV-RNA-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen, beispielsweise zur Verwendung als Leberzellspezifische Genfährten in der Gentherapie. Auf Grund des ausgeprägten Leberzelltropismus des HCV und der Möglichkeit, Teile des Genoms durch heterologe Sequenzen zu ersetzen, lassen sich HCV-RNA-Konstrukte herstellen, bei denen beispielsweise die Strukturproteine durch ein therapeutisch wirksames Gen ersetzt werden. Das so erhaltene HCV-RNA-Konstrukt wird in Zellen eingeschleust, vorzugsweise mittels Transfektion, die die fehlenden HCV-Funktionen, beispielsweise die Strukturproteine, konstitutiv oder induzierbar exprimieren. Durch diese dem Fachmann unter dem Begriff der 'Transkomplementation' bekannte Technik lassen sich Viruspartikel erzeugen, in die das HCV-RNA-Konstrukt eingebaut wird. Die so erhaltenen Partikel können für die Infektion vorzugsweise von Leberzellen verwendet werden. In diesen wird das therapeutisch wirksame Fremdgen zur Expression gebracht und entfaltet damit seine therapeutische Wirkung.
- Das Auffinden permissiver Zellen, d.h. Zellen, in denen eine produktive Virusvermehrung erfolgt. Zu diesem Zweck wird entweder eines der vorgenannten HCV-RNA-Genomkonstrukte verwendet, das zur Bildung kompletter infektiöser Viren befähigt ist, oder es wird eines der vorgenannten HCV-Subgenom-Konstrukte eingesetzt, das allerdings zunächst gemäß vorgenanntem Beispiel in eine Zelllinie transfiziert wird, die die fehlenden Funktionen konstitutiv oder induzierbar exprimiert. In all diesen Fällen entstehen Viruspartikel, die zusätzlich zur HCV-Sequenz ein Resistenz- und/oder Reportergen tragen. Zum Auffinden von Zellen, in denen das HCV replizieren kann, werden diese Zellen mit den so hergestellten Viren infiziert und einer Antibiotikumsselektion unterzogen oder, in Abhängigkeit vom HCV-RNA-Konstrukt, mittels Nachweis der Expression des Reportergens untersucht. Da eine Antibiotikumresistenz bzw. eine Expression des Reportergens nur dann nachweisbar ist, wenn das HCV-RNA-Konstrukt repliziert, müssen die so gefundenen Zellen permissiv sein. Auf diese Weise lassen sich nahezu beliebige Zelllinien oder primäre Zellkulturen hinsichtlich der Permissivität testen und auffinden.

[0034] Das erfindungsgemäße Zellkultursystem erlaubt auch das gezielte Auffinden von HCV-RNA-Konstrukten, bei denen es auf Grund von Mutationen, die sich entweder zufällig im Rahmen der HCV-RNA-Replikation ereignen oder die gezielt in das Konstrukt eingeführt werden, zu einer Steigerung der Replikationseffizienz kommt. Solche Mutationen, die zu einer Veränderung der Replikation des HCV-RNA-Konstrukts führen, sind dem Fachmann als adaptive

Mutationen bekannt. Die Erfindung umfaßt deshalb auch Verfahren zur Gewinnung von zellkultur-adaptierten Mutanten eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts gemäß vorstehender Beschreibung, wobei die Mutanten gegenüber dem originären HCV-RNA-Konstrukt eine erhöhte Replikationseffizienz aufweisen. Sie umfaßt desweiteren ein Verfahren zur Herstellung von Mutanten eines HCV-RNA-Vollängengenoms oder eines HCV-RNA-Teilgenoms oder eines beliebigen HCV-RNA-Konstrukts mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Vollängengenom oder -Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffizienz, sowie zellkultur-adaptierte Mutanten von HCV-RNA-Konstrukten, HCV-Vollängengenomen und HCV-Teilgenomen mit im Vergleich zu den ursprünglichen Konstrukten, Teil- oder Vollängengenomen erhöhter Replikationseffizienz.

[0035] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von zellkultur-adaptierten Mutanten eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts, wobei die Mutanten gegenüber dem HCV-RNA-Konstrukt eine erhöhte Replikationseffizienz aufweisen, ist dadurch gekennzeichnet, daß man ein Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen nach einem der Ansprüche 4 bis 19 ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte isoliert.

[0036] Bei einer vorteilhaften Weiterbildung dieses Herstellungsverfahrens werden die isolierten HCV-RNA-Konstrukte wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen eines Zellkultursystems nach Anspruch 1 eingeschleust, das dabei erhaltene Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial das isolierte HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, die gewachsenen Zellklone geerntet und daraus die HCV-RNA-Konstrukte isoliert.

Mit dieser Verfahrensvariante kann der Grad der adaptiven Mutationen und damit der Grad der Replikationseffizienz in den betreffenden HCV-RNA-Konstrukten noch gesteigert werden.

[0037] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Mutanten eines HCV - Vollängengenoms oder eines HCV- Teilgenoms oder eines beliebigen HCV-RNA-Konstrukts mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV- Vollängengenom oder - Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffizienz zeichnet sich dadurch aus, daß man mit Hilfe eines der beiden vorstehend genannten Herstellungsverfahren eine zellkultur-adaptierte Mutante eines HCV-RNA-Konstrukts herstellt, diese aus den Zellen isoliert, mit im Stand der Technik bekannten Methoden kloniert und sequenziert und durch Vergleich mit der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukts die Art, Anzahl und Positionen der Mutationen bestimmt, und diese Mutationen dann entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, welche die betreffenden Mutationen enthalten, in ein (isoliertes) HCV-Vollängen- oder -teilgenom oder ein beliebiges HCV-RNA-Konstrukt einführt.

Zum Nachweis bzw. zur Verifizierung derjenigen Mutationen, die tatsächlich eine Veränderung der Replikation und insbesondere eine Replikationssteigerung bewirken, kann ein Test durchgeführt werden, bei dem die bestimmten Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche in das ursprüngliche HCV-RNA-Konstrukt eingeführt und dieses wiederum in Zellkultur eingeschleust wird. Wenn die eingeführte Mutation tatsächlich zu einer Steigerung der Replikation führt, sollte im Fall eines HCV-RNA-Konstrukts mit selektierbarem Markergen die Zahl der resistenten Zellklone bei dem künstlich mutierten Konstrukt deutlich höher sein als bei dem unbehandelten Konstrukt. Im Fall eines Konstrukts mit einem Reportergen sollte die Aktivität bzw. Menge des Reporters bei dem künstlich mutierten Konstrukt deutlich höher sein als bei dem unbehandelten.

[0038] Die erfindungsgemäßen zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukte mit hoher Replikationseffizienz sind dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche von einem HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 19 ableitbar sind und daß sie mit einem der beiden vorstehend genannten Herstellungsverfahren erhältlich sind.

[0039] Diese zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukte können dazu verwendet werden, beliebige HCV-RNA-Konstrukte oder HCV-Vollängen- oder Teilgenome mit erhöhter Replikationseffizienz herzustellen. Dabei können sowohl Konstrukte mit einem selektierbaren Resistenzgen als auch Konstrukte ohne ein solches bzw. mit einem nicht-selektierbaren Reportergen (z.B. Luziferase) hergestellt werden, denn aufgrund der sehr hohen Replikationseffizienz des zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukts kann dessen Replikation auch in nicht-selektionierten Zellen nachgewiesen werden.

Die erfindungsgemäßen zellkultur-adaptierten Mutanten eines HCV-RNA-Konstrukts oder eines HCV-Vollängengenoms oder eines HCV-Teilgenoms mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukt oder dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom erhöhter Replikationseffizienz, sind dadurch charakterisiert, daß sie mit einem Verfahren erhältlich sind, bei dem man in einem zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukt durch Sequenzanalyse und Sequenzvergleich die Art und Anzahl der Mutationen bestimmt und diese Mutationen in ein HCV-RNA-Konstrukt, insbesondere in ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 4 bis 19, oder in ein (isoliertes) HCV-RNA-Vollängengenom einführt, entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten.

[0040] Eine Gruppe ganz bevorzugter HCV-RNA-Konstrukte, HCV-Vollängengenome und HCV-Teilgenomen mit hoher und sehr hoher Replikationseffizienz und infolgedessen sehr guter Eignung für die praktische Anwendung ist

EP 1 043 399 A2

dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere oder alle der in Tabelle 3 aufgelisteten Aminosäure- bzw. Nukleotidaustausche und/oder einen oder mehrere der folgenden Aminosäureaustausche aufweist: 1283 arg -> gly , 1383 glu -> ala , 1577 lys -> arg , 1609 lys -> glu , 1936 pro -> ser , 2163 glu -> gly , 2330 lys -> glu , 2442 ile -> val. (Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen des Polyproteins des HCV-Isolats con1, siehe Tabelle 1).

5

Besondere Eigenschaften der in den Sequenzprotokollen angegebenen Sequenzen:

SEQ ID-NO: 1

10 **[0041]**

Name: I389/Core-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

15

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters

20

4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7

25

9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)

30

14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 2

35 **[0042]**

Name: I337/NS2-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

40

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1181: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1190-1800: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters

45

4. 1801-8403: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 2 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1801-2451: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
6. 2452-4344: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
7. 4345-4506: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
8. 4507-5289: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
9. 5290-6630: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
10. 6631-8403: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
11. 8407-8637: HCV 3' nicht-translatierte Region

55

SEQ ID-NO: 3

[0043]

- 5 Name: I389/NS3-3'/wt
Aufbau (Nukleotidpositionen):
1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
 2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
 - 10 3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
 4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B
 5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
 - 15 6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
 7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
 8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
 9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
 10. 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 4

[0044]

- 25 Name: I337/NS3-3'/wt
Aufbau (Nukleotidpositionen):
1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
 2. 342-1181: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
 - 30 3. 1190-1800: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
 4. 1801-7758: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B
 5. 1801-3696: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
 - 35 6. 3697-3858: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
 7. 3859-4641: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
 8. 4642-5982: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
 9. 5983-7755: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
 10. 7759-7989: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 5

[0045]

- 45 Name: I389/NS2-3'/wt
Aufbau (Nukleotidpositionen):
1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
 2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
 - 50 3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
 4. 1813-8418: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 2 bis Nichtstrukturprotein 5B
 5. 1813-2463: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
 - 55 6. 2464-4356: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
 7. 4357-4518: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
 8. 4519-5301: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
 9. 5302-6642: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)

EP 1 043 399 A2

10. 6643-8415: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
11. 8419-8649: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 6

[0046]

Name: I389/NS3-3'/9-13F

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 9-13F
5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 7

[0047]

Name: I389/Core-3'/9-13F

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 9-13F
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 8

[0048]

Name: I389/NS3-3'/5.1

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker

EP 1 043 399 A2

3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 5.1

5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5B (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 9

[0049]

Name: I389/Core-3'/5.1

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 5.1

5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 10

[0050]

Name: I389/NS3-3'/19

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 19

5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 11

[0051]

Name: I389/Core-3'/19

Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 19
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

[0052] Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehörigen Tabellen und Figuren näher erläutert. Die erwähnten Figuren zeigen

Fig. 1 A: Die Struktur eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts Ganz oben ist eine schematische Darstellung der Struktur des kompletten parentalen HCV-Genoms gegeben mit den Positionen der Gene für die Spaltungsprodukte core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B innerhalb des Polyproteins, und den 5' und 3' nichttranslatierten Regionen (5' NTR und 3' NTR) — als Horizontalbalken dargestellt —, und mit den beiden für die Erzeugung der Subgenom-Konstrukte ausgewählten Positionen, nämlich der Position der 'GDD-katalytischen Domäne' der NS5B RNA Polymerase (GDD) und der Position der 3' Grenze der HCV-IRES (Nukleotidpositionen 1 bis 377 bzw. 1 bis 389) — oberhalb des Genomschemas eingezeichnet —. Die Zahlen unterhalb des Genomschemas bezeichnen die entsprechenden Nukleotidpositionen.

Darunter sind schematische Darstellungen der Strukturen zweier erfindungsgemäßer, modifizierter HCV-RNA-Konstrukte (Subgenom) gezeigt, bestehend aus der 5' HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (Neo^R), der EMCV-IRES (E-I) und den HCV Sequenzen von NS2 bzw. NS3 bis zum authentischen 3' Ende. Die Position der das NS5B Polymerase GDD-Motiv umfassenden 10 Aminosäuren-Deletion ist jeweils mit einem Dreieck (Δ) markiert.

Fig. 1 B: Das Ergebnis einer denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von replizierter Plusstrang-RNA in transfizierten subpassagierten Huh-7 Zellklonen. Die Positionen der HCV-spezifischen RNAs (Pfeile) und der 28S rRNA sind rechts von Spur 12 angegeben, die Größen (Anzahlen der Nukleotide) der RNA-Marker (M) sind links von Spur 1 angegeben.

Fig. 1 C : Das Ergebnis eines PCR-Tests mit nachfolgendem Southern-Blot zum Nachweis der Abwesenheit von integrierter Replikon-DNA in den meisten der selektierten Zellklone. Spuren 1 und 2 zeigen die Positivkontrollen, Spur 13 die Negativ-Kontrolle. Die Zahlenangaben links der Spur 1 bezeichnen die Größe der Nukleotid-Marker-Moleküle.

Fig. 2 A: Das Ergebnis eines PCR-Tests mit nachfolgendem Southern-Blot zum sensitiven Ausschluß integrierter Replikon-DNA (Plasmid Moleküle I₃₇₇/NS3-3'/wt) in einem HCV-RNA-Konstrukt-haltigen Zellklon (9-13). Die Spuren 7 bis 11 repräsentieren das Ergebnis einer Titration von DNA-Molekülen des Konstrukts I₃₇₇/NS3-3'/wt ohne Zugabe von Gesamt-DNA des Zellklons 9-13 und die Spuren 2 - 6 repräsentieren die gleichen Plasmidmoleküle mit Zugabe von jeweils 1 µg 9-13 DNA vor der PCR (zwecks Ausschluß

eines Inhibitors der PCR in der DNA-Präparation). Spur 13 repräsentiert die Negativ-Kontrolle (PCR ohne DNA-Sonde). Spur 1 zeigt das Ergebnis, das mit einem µg Gesamt-DNA des Zellkons 9-13 erhalten wurde.

- 5 **Fig. 2 B:** Das Ergebnis eines Northern-Blot-Tests zur Quantifizierung von HCV Plus- und Minusstrang RNA. Die Pfeile markieren die Positionen von Replikon-RNA. Die "plus" und "minus" -Abgaben bezeichnen die positive (plus) bzw. negative (minus) Polarität der RNA-Kontrollen, die auf das Gel aufgetragen wurden. "Minusstrang" und "Plusstrang" bezeichnen die Spezifität der radioaktiven RNA-Sonden.
- 10 **Fig. 2 C:** Ergebnis einer Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese nach radioaktiver Markierung der intrazellulär replizierten HCV-RNA zum Nachweis der Resistenz der HCV-RNA-Replikation gegen Dactinomycin.
- Fig. 3 A:** Nachweis von HCV-spezifischen Antigenen in den selektierten Zellklonen mittels Immunopräzipitation nach metabolischer Radioaktivmarkierung. Die Spuren 7 - 9 repräsentieren authentische Größenmarker (die nach transienster Expression eines HCV-RNA-Konstrukts in Huh-7-Zellen erhalten wurden); identifizierte HCV-Proteine sind am linken Rand von Spur 1 markiert, die Molekulargewichte (in Kilodalton) sind am rechten Rand von Spur 9 angegeben.
- 15 **Fig. 3 B:** Ergebnisse eines Immunfluoreszenztests zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von HCV Antigenen.
- 20 **Fig. 4:** Schematische Darstellung der Struktur eines erfindungsgemäßen selektierbaren HCV-RNA-Konstrukts (komplettes Genom) bestehend aus der 5' HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (NeoR), einem heterologen IRES-Element, z.B. des Encephalomyocarditisvirus (E-I), dem vollständigen HCV-Leseraster und der authentischen 3' NTR.
- 25 **Fig. 5:** Schematische Darstellung der Struktur von HCV-RNA-Konstrukten mit insertiertem Antibiotikumresistenzgen (A) innerhalb der für das Polyprotein kodierenden Nukleotidsequenz (monocistronische RNA), und (B) innerhalb der 3' NTR (bicistronische RNA).
- 30 **Fig. 6:** Schematische Darstellung der Struktur von HCV-RNA-Konstrukten mit insertiertem Reportergen (A) als Teil eines HCV-Replikons von NS3 bis NS5B; — das Reporterprotein wird letztendlich durch virale oder durch zelluläre Proteasen aus dem Polyprotein gespalten und das selektierbare Markergen (Selektionsgen) bzw. das Resistenzgen durch Kontransfektion in die Zellen einschleust, (B) als Teil eines Fusionsgens aus Resistenz- und Reportergen (z.B. für die Neomycinphosphotransferase und green fluorescent Protein) (C) als Teil eines Replikons aus Resistenz- und Reportergen (z.B. für die Neomycinphosphotransferase und das green fluorescent Protein), die über eine Nukleotidsequenz verbunden sind, welche für eine Aminosäuresequenz kodiert (schraffierter Bereich), die von einer Protease gespalten werden kann oder die über eine selbstspaltende (autokatalytische) Aktivität verfügt, (D) als unabhängiges Gen (hier green fluorescent protein), das von einer eigenen internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) aus exprimiert wird; — das Resistenzgen (hier: Neomycinphosphotransferase-Gen) wird davon unabhängig ebenfalls von einer eigenen internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) aus exprimiert (polycistronisches Konstrukt).
- 35 **Fig. 7:** Schematische Darstellung der Struktur eines HCV-RNA-Konstrukts bei dem das Resistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA-Sequenz verbunden ist. Die dicken Linien stellen die HCV 5' und 3' NTRs dar, E-I ist eine heterologe interne Ribosomenbindungsstelle, die für die Expression des Resistenzgens notwendig ist, und das graue Quadrat stellt das Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym dar.
- 40 **Fig. 8:** Schematische Darstellung der Struktur eines HCV-RNA-Konstrukts mit Resistenzgen und integriertem Fremdgen.
- 45 **Fig. 9:** Methodisches Vorgehen zum Vergleich der spezifischen Infektiosität (ausgedrückt als Anzahl gebildeter Zellkolonien) von Gesamt-RNA versus in vitro Transkripte. HCV-RNA wird mittels in vitro Transkription eines entsprechenden RNA-Konstrukts hergestellt und durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD 260 nm) quantifiziert. Eine definierte Anzahl dieser Moleküle wird mit einer bestimmten Menge Gesamt-RNA von naiven Huh-7 Zellen gemischt und diese Mischung mit Hilfe der Elektroporation in
- 50
- 55

naïve Huh-7 Zellen eingeschleust. Parallel dazu wird die Gesamt-RNA eines Zellklons, der mit der in Figur 1 beschriebenen Methode hergestellt wurde, mit einem im Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert und die Menge der darin enthaltenen HCV-RNA mittels Northern-blot unter Verwendung einer HCV-spezifischen RNA-Sonde und anschließender Quantifizierung mittels Phosphorimager bestimmt. Eine definierte Menge dieser Gesamt-RNA wird analog den in vitro Transkripten in naïve Huh-7 Zellen transfiziert. Diese Zellen in beiden Ansätzen werden danach einer G418-Selektion unterzogen und die Anzahl der gebildeten Kolonien durch Auszählen nach fixieren und anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blau bestimmt. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wird jedem Transfektionsansatz 1 µg eines Plasmids zugesetzt, das die Expression der Luziferase erlaubt. Ein Aliquot der transfizierten Zellen wird nach 24 Stunden geerntet und die Luziferaseaktivität im jeweiligen Zellysat bestimmt. Die Anzahl der Kolonien wird jeweils auf die Luziferaseexpression normiert.

Fig. 10: Sequenzanalyse der 9-13 Klone. Gesamt-RNA des Zellklons 9-13, der durch Transfektion des HCV-RNA-Konstrukts I377/NS3-3' entstand, wurde mit einem im Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert und das HCV-RNA-Konstrukt von Nukleotidposition 59 bis 9386 mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' unter Verwendung der primer S59 und A9413 amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden kloniert und 11 Klone (genannt 9-13 A - K) vollständig sequenziert, wobei sich die Klone D und I, E und G sowie H und J als identisch erwiesen. Die Positionen der Aminosäureunterschiede in der NS3-5B Region zwischen den reklonierten HCV-RNAs und dem parentalen Konstrukt sind mit einem dicken vertikalen Strich beim jeweiligen Klon markiert. Jeder Klon wurde mit dem Restriktionsenzym *Sfi* I verdaut und das jeweilige Fragment in das parentale Konstrukt inseriert. Diese Klone wurden jeweils in Huh-7 Zellen transfiziert und die Zellen wie in Figur 1 beschrieben einer Selektion unterzogen. Die Anzahl der mit jedem Konstrukt erhaltenen Zellklone ist rechts neben dem jeweiligen Konstrukt vermerkt.

Fig. 11 A: Prinzip der Replikationsbestimmung mit Hilfe eines Reportergens. Im oberen Teil der Figur ist das HCV-DNA-Konstrukt I₃₈₉/Luc/NS3-3' dargestellt, bestehend aus der HCV 5' NTR (Nukleotidposition 1-389), dem Luziferasegen (*luc*), der IRES des Encephalomyocarditis Virus, dem HCV NS3-5B und der 3' NTR. Die Position des aktiven Zentrums der NS5B RNA-Polymerase, in das ein inaktivierender Aminosäureaustausch eingeführt wurde, ist mit 'GND' angedeutet. Die Plasmide, die für das replikationskompetente bzw. das defekte HCV-RNA-Konstrukt kodieren, werden mit dem Restriktionsenzym *Sca* I verdaut und in eine in vitro Transkription mit der T7 RNA-Polymerase eingesetzt. Nach Entfernung der Matrizen-DNA werden die jeweiligen HCV-RNA-Konstrukte mittels Elektroporation in naïve Huh-7 Zellen eingeschleust und diese in regelmäßigen Abständen geerntet.

Fig. 11 B: Vergleich der Luziferaseaktivitäten in Zellen transfiziert mit dem parentalen HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/Luc/NS3-3'/wt (wt) oder den folgenden Varianten: Der inaktiven RNA (318 DN), der Variante 9-13F oder der Variante 5.1. Die Zellen wurden 6 (nicht gezeigt), 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden nach der Transfektion geerntet und die Luziferaseaktivitäten luminometrisch bestimmt.

Fig. 12: Selektionierbare HCV-Vollängengenome (Konstrukte I₃₈₉/core-3'/5.1 und I₃₈₉/core-3'/9-13F).

(A) Schematische Darstellung des Vollängenkonstrukts. Der Bereich zwischen den beiden ange-deuteten Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym *Sfi* I entspricht den Sequenzen der hoch-adaptierten RNA-Varianten 5.1. oder 9-13F.

(B) Anzahl der Kolonien die nach Transfektion von jeweils 0,1 µg in vitro transkribierter RNA der unter A dargestellten Konstrukte I₃₈₉/core-3'/5.1 in HUH7-Zellen erhalten wurden. Angegeben ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes.

(C) Nachweis autonom replizierender HCV-Vollängen-RNAs in G418-resistenten Zellklonen, die nach Transfektion des entsprechenden in vitro Transkripts erhalten wurden. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm eines Northern Blots, der mit einer Sonde gegen das *neo*-Resistenzgen und der HCV 5' NTR hybridisiert wurde. Die in Spur 1 und 2 dargestellten Kontrollen entsprechen jeweils 10⁸ Molekülen der angegebenen in vitro Transkripte, gemischt mit Gesamt-RNA aus naiven Huh-7 Zellen. Die Negativkontrolle enthält ausschließlich Gesamt RNA aus naiven Huh-7 Zellen (Spur 3). Die Spuren 4-9 enthalten 3-10 µg Gesamt-RNA aus G418-resistenten Zellklonen, die nach Transfektion von in vitro transkribierter I₃₈₉/core-3'/5.1-RNA bzw. I₃₈₉/core-3'/9-13F-RNA erhalten wurden. Die für die Selektion verwendete G418-Konzentration ist jeweils angegeben. Fünf der dargestellten Zellklone enthalten die hoch adaptierte RNA-Variante 5.1 (Spur 4-8), einer die adaptierte RNA-Variante 9-13F (Spur 9).

Fig. 13: HCV-RNA-Konstrukte mit einem Reportergen. (A) Bicistronische HCV-RNA-Konstrukte. Das Reportergen wird mit Hilfe einer separaten IRES translatiert. (B) Monocistronische HCV-RNA-Konstrukte. Das Reportergenprodukt wird als Fusionsprotein mit einem HCV-Protein exprimiert. Die beiden Anteile sind über eine Erkennungssequenz für eine virale oder zelluläre Protease verbunden, die eine proteolytische Trennung der beiden fusionierten Proteinanteile erlaubt. Im gezeigten Beispiel wurden das Reportergenprodukt und das jeweilige HCV-Protein über eine Erkennungssequenz für Ubiquitin (Ub) fusioniert.

Fig. 14: Tricistronisches Vollängen HCV-RNA-Konstrukt, das zusätzlich zum Resistenzgen ein Fremdgen inseriert besitzt.

Fig. 15: Monocistronische HCV-RNA-Konstrukte, bei denen das Resistenzgenprodukt als Fusionsprotein mit dem HCV-Anteil exprimiert wird. Das Resistenzgen (RG) ist entweder als Fusionsprotein aktiv oder es wird so mit einer proteolytisch spaltbaren Sequenz mit dem HCV-Anteil fusioniert, daß das Resistenzgenprodukt durch eine zelluläre oder virale Protease vom HCV-Anteil abgespalten wird. Im gezeigten Beispiel wurde das Resistenzgen über die für Ubiquitin (Ub) kodierende Sequenz mit dem jeweiligen HCV-Anteil fusioniert.

Beispiel 1: Herstellung von HCV-RNA-Konstrukten

(A) Synthese und Klonierung eines vollständigen HCV-Konsensusgenoms mittels RT-PCR

[0053] Aus der Leber eines chronisch infizierten Patienten wurde das HCV-Genom, d.h. die HCV-RNA wie nachfolgend beschrieben isoliert:

[0054] Aus ca. 100 mg Leber wurde die komplette RNA gemäß dem Verfahren von Chomczynski und Sacchi (1987, Anal. Biochem. 162, 156) isoliert. Mit 1 µg dieser isolierten RNA wurde eine reverse Transkription mit den Primern A6103 (GCTATCAGCCGGTTCATCCACTGC) oder A9413 (CAGGATGGCCTATTGG CCTGGAG) und dem 'expand reverse transcriptase'-System (Boehringer Mannheim, Deutschland) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Mit den Produkten dieser reversen Transkription (RT) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR=polymerase chain reaction) durchgeführt, und zwar unter Verwendung des 'expand long template'-Systems (Boehringer Mannheim, Deutschland), wobei der Puffer mit 2% Dimethylsulfoxid-Gehalt eingesetzt wurde. Nach einer Stunde bei 42°C wurde 1/8 dieses Reaktionsansatzes in einem ersten PCR-Durchgang mit den Primern A6103 und S59 (TGTCTTCACGCA-GAAAGCGTCTAG) oder A9413 und S4542 (GATGAGCT CGCCGCGAAGCTGTCC) eingesetzt. Nach 40 Zyklen wurde 1/10 dieses Reaktionsansatzes in einem zweiten PCR-Durchgang mit den Primern S59 und A4919 (AGCACAGCCGCGTCATAGCACTCG) oder S4542 und A9386 (TTAGTCCCCG TTCATCGGTTGG) eingesetzt. Nach 30 Zyklen wurden die PCR-Produkte mittels präparativer Agarose-Gel-Elektrophorese gereinigt und die dabei eluierten Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) oder pBSK II (Stratagene) ligiert. Vier Klone von jedem Fragment wurden analysiert und sequenziert, und es wurde eine Konsensus-Sequenz ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Sequenzen miteinander verglichen. Die Positionen, an denen sich die Sequenz eines der Fragmente von den übrigen unterschied, wurde als unerwünschte Mutation betrachtet. Im Fall von Mehrdeutigkeiten der Sequenz wurden kürzere sich überlappende PCR-Fragmente der betreffenden Region amplifiziert und mehrere Klone sequenziert. Auf diese Weise konnten zahlreiche potentielle Mutationen in jedem Fragment identifiziert und somit eine isolat-spezifische Konsensussequenz etabliert werden. Diese etablierte Konsensussequenz bzw. dieses Genom gehört zum weltweit verbreiteten Genotyp 1b. Die nicht translatierte Region am 3'-Ende (=3' NTR) wurde mittels konventioneller PCR erhalten, wobei ein Antisense-Primer eingesetzt wurde, der die letzten 24 Nukleotide des im Stand der Technik bekannten 'X-tails' (Tanaka et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 744; und Rice, PCT/US 96/14033) abdeckt. Die authentische nicht translatierte Region am 5'-Ende (=5' NTR) strangabwärts vom T7 Promotor wurde mittels PCR erzeugt, wobei zum einen ein Oligonukleotid verwendet wurde, das einem verkürzten T7 Promotor (TAA TAC GAC TCA CTA TAG) und den ersten 88 Nukleotiden von HCV entspricht, und zum anderen eines der vorgenannten Plasmide eingesetzt wurde, das eines der 5' Fragmente des Genoms trägt. Aus den subgenomischen Fragmenten mit der geringsten Anzahl an Nicht-Konsensus-Austauschen wurde ein komplettes HCV-Konsensusgenom zusammengesetzt und in einen modifizierten pBR322-Vektor inseriert. Abweichungen von der Konsensussequenz wurden mittels ortsgerechter Mutagenese ("site-directed mutagenesis") beseitigt. Um "run-off"-Transkripte mit einem authentischen 3' Ende herzustellen, wurde die 3'-NTR der Isolate (mit dem Ende TGT) zu AGT modifiziert (gemäß der Sequenz vom Genotyp 3 = Klon 'WS' nach Kolykhalov et al., 1996, J. Virol. 70, 3363) und außerdem wurde ein zusätzlicher Nukleotidaustausch an Position 9562 vorgenommen, um die A:T Basenpaarung in der Haarnadelstruktur am 3' Ende der 3' NTR (Kolykhalov et al. ibid.) beizubehalten. Um eine interne Restriktionsstelle für das Enzym Scal zu beseitigen, wurde ferner ein sog. stiller ("silent") Nukleotidaustausch vorgenommen. Nach dem Zusammenfügen des Vollängen-Genoms mit passenden 5'- und 3' NTRen wurde die komplette HCV-Sequenz überprüft. Dabei wurde kein ungewünschter Nukleotidaustausch

gefunden.

[0055] Das auf diese Weise hergestellte HCV-Genom sollte per Definition hepatotrop sein.

(B) Synthese selektierbarer HCV-Subgenom-Konstrukte

[0056] Unter Verwendung des unter (A) beschriebenen Konsensusgenoms wurden HCV-Subgenom-Konstrukte hergestellt, die das Antibiotikumresistenzgen Neomycin-Phosphotransferase (NPT) und zwei Sequenzen von internen Ribosomenbindungsstellen (IRES) enthalten. Die hierfür angewendeten biochemischen Verfahrenstechniken sind dem Fachmann bekannt und geläufig (siehe: Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989, *Molecularcloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al. (eds.), 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1-3, John Wiley & Sons Inc., New York). Das Antibiotikumresistenzgen wurde unmittelbar hinter der 5' NTR inseriert, wodurch eine bicistronische RNA erhalten wurde (siehe Fig. 1 A). Ebenso gut kann das Antibiotikumresistenzgen aber auch an anderer Stelle des HCV-Subgenom-Konstrukts inseriert werden, beispielsweise innerhalb der für das Polyprotein kodierenden Nukleotidsequenz, wodurch eine monocistronische RNA erhalten wird (siehe Fig. 5 A) oder in die 3' NTR (siehe Fig. 5 B). Bei den IRES-Elementen handelt es sich zum einen um eine der beiden HCV-IRES-Varianten Nukleotide 1-377 oder Nukleotide 1-389, und zum anderen um die IRES des Enzephalomyocarditis Virus, die die Translation der HCV Sequenz strangabwärts von den Genen für NS2 oder NS3 bis zu dem authentischen 3' Ende des Genoms steuert.

[0057] Die beiden genannten HCV-IRES-Varianten wurden wie folgt ermittelt: Auf der Basis von Deletionsanalysen der 3' Grenze der HCV-IRES (Reynolds et al. 1995, *EMBO J.* 14, 6010) wurden verschiedene Abschnitte der 5' NTR mit dem NPT Gen fusioniert und anhand von Kointransfektionen mit einem das T7 RNA Polymerase Gen enthaltenden Plasmid hinsichtlich der maximalen Anzahl gebildeter Kolonien analysiert. Die besten Ergebnisse wurden mit den HCV Sequenzen von 1-377 und 1-389 erhalten. Da sich das AUG-Startkodon des HCV Polyproteins an Position 342 befindet und somit in der IRES-Sequenz enthalten ist, kommt es zu einer Fusion von 12 bzw. 16 Aminosäuren des HCV-Kapsidproteins ("Core-Proteins") mit der Neomycin Phosphotransferase (siehe Fig. 1 A).

[0058] Diese modifizierten HCV-Subgenom-Konstrukte erhielten dementsprechend die Bezeichnungen I₃₇₇/NS2-3' (oder I₃₇₇/NS3-3') und I₃₈₉/NS2-3' (oder I₃₈₉/NS3-3'). Sie sind in Fig. 1A schematisch dargestellt.

[0059] Mit in-vitro-Transkripten dieser modifizierten parentalen HCV-Subgenom-Konstrukte I₃₇₇/NS2-3' (oder I₃₇₇/NS3-3') und I₃₈₉/NS2-3' (oder I₃₈₉/NS3-3') wurden verschiedene Zelllinien und Primärzellkulturen von menschlichen Hepatocyten transfiziert.

[0060] Als parallele Negativ-Kontrolle zu allen Transfektionsexperimenten wurde zu jedem modifizierten parentalen HCV-Subgenom-Konstrukt ein entsprechend modifiziertes aber defektes Subgenom konstruiert, das sich von dem parentalen dadurch unterscheidet, daß es innerhalb des Leserasters eine Deletion von 10 Aminosäuren aufweist, die das aktive Zentrum der NS5B RNA Polymerase umfaßt (Behrens et al., 1996, *EMBO J.* 15, 12; und Lohmann et al., 1997, *J. Virol.* 71, 8416).

(C) Synthese selektierbarer HCV-Genom-Konstrukte

[0061] Ein NS2-3' Subgenomkonstrukt, das am 5' Ende mit einem Fragment des Luziferasegens und der vollständigen EMCV-IRES verbunden ist, wurde mit NcoI und SpeI restringiert und mittels präparativer Agarosegelelektrophorese gereinigt. Der so erhaltene Vektor wurde in einer 3-Faktor Ligation mit einem NcoI/NotI-HCV-Fragment, entsprechend den Nukleotidpositionen 342 bis 1968 des HCV-Genoms und mit einem NotI/SpeI-Fragment, entsprechend den Nukleotidpositionen 1968-9605 ligiert. Das entstandene Konstrukt, bei dem das vollständige HCV-Leseraster und die 3' NTR stromabwärts dem Luziferasegenfragment und der EMCV-IRES liegen, wurde danach mit PmeI und SpeI restringiert und mit dem analog restringierten I₃₈₉/NS3-3'/wt-Subgenomkonstrukt-Vektor ligiert. Dieses selektierbare HCV-Genomkonstrukt ist in Fig. 4 dargestellt.

(D) Herstellung von den HCV-RNA-Konstrukten entsprechenden in-vitro-Transkripten

[0062] Die vorstehend beschriebenen gereinigten Plasmid DNAs wurden mit Scal linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Präzipitation in eine In-vitro-Transkriptionsreaktion eingesetzt unter Verwendung der folgenden Komponenten: 80 mM HEPES, pH 7.5, 12,5 mM MgCl₂, 2 mM Spermidin, 40 mM Dithiothreitol, 2 mM von jedem NTP, 1 Einheit RNasin/µl, 50 µg/ml restringierte DNA und ca. 2 Einheiten/µl T7 RNA Polymerase. Nach 2 Std. bei 37°C wurde die Hälfte der Menge an T7 Polymerase zugegeben und der Reaktionsansatz weitere 2h inkubiert. Zur Entfernung von DNA wurde die Mischung mit saurem Phenol extrahiert (U. Kedzierski, J.C. Porte, 1991, *Bio Techniques* 10, 210), mit Isopropanol präzipitiert, das Pellet in Wasser gelöst und mit DNase (2 Einheiten pro µg DNA) für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Extraktion mit saurem Phenol, saurem Phenol/Chloroform und Chloroform und Isopropanol-Präzipitation wurde die gelöste RNA mittel optischer Dichtemessungen quantifiziert und

ihre Unversehrtheit mittels Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Beispiel 2: Transfektionsexperimente mit der Hepatomazelllinie Huh-7

- 5 **[0063]** Bei sämtlichen Transfektionsexperimenten wurde sorgfältig darauf geachtet, daß jegliche Matrizen-DNA zuvor entfernt worden war, um zu vermeiden, daß solche DNA in transfizierte Zellen integrieren und diesen unabhängig von einer HCV-Replikation eine Neomycin-Resistenz vermitteln konnte. Deshalb wurde im Anschluß an die in-vitro-Transkription (Beispiel 1 D) die Reaktionsmischung mit 2 Einheiten DNase pro μg DNA für 60 Min. bei 37°C behandelt und mit saurem Phenol, saurem Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Vor der Verwendung für die Transfektion
- 10 wurde die präzipitierte RNA mittels Formaldehyd Agarose Gel Elektrophorese analysiert.
- [0064]** Es wurden drei separate Transfektionsexperimente mit der hoch differenzierten humanen Hepatomazelllinie Huh-7 (gemäß Nakabayashi et al. 1982, *Cancer Res.* 42, 3858) durchgeführt. Dabei wurde jeweils 15 μg RNA in 8×10^6 Huh-7-Zellen mit Hilfe der Elektroporation eingebracht und diese Zellen anschließend in Kulturschalen von 10 cm Durchmesser ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurde Neomycin (= G418) in einer Endkonzentration von 1
- 15 mg/ml zugegeben. Das Kulturmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Nach 3 - 5 Wochen waren kleine Kolonien erkennbar, die isoliert und unter den gleichen Kulturbedingungen passagiert wurden.
- [0065]** Die Zellklone, die im Verlauf des ersten Experiments erhalten wurden, wurden isoliert und subpassagiert. Während dieser Prozedur starben die meisten Klone und die Endausbeute betrug nur noch 9 Klone von Zellen, die mit den parentalen HCV-Subgenom-Konstrukten transfiziert worden waren und 1 Klon (Klone 8-1) von Zellen, die mit einem defekten HCV-Genom-Konstrukt, nämlich einer defekten NS2-3' HCV-RNA transfiziert worden waren. Außer einer verkürzten Verdopplungszeit und dem gelegentlichen Auftreten von irregulär geformten Zellen wurden keine beständigen morphologischen Unterschiede zwischen diesen 9 Zellklonen und dem einen Zellklon (Klon 8-1) oder den parentalen Huh-7 Zellen gefunden.
- 20 **[0066]** Die Hauptkriterien für funktionierende HCV-Genomkonstrukte sind die Bildung von viraler RNA mit korrekter Größe und die Abwesenheit von (integrierter) Plasmid DNA, die eine G418-Resistenz übertragen bzw. vermitteln könnte.
- [0067]** Um die HCV-RNA in den Huh-7-Zellen zu bestimmen, wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels des gängigen Northern-Blot Verfahrens unter Verwendung einer Plusstrang-spezifischen Ribosonde (= RNA-Sonde) analysiert. Hierfür wurde von den jeweiligen Zellklonen Gesamt-RNA nach der Methode von Chomczynski und Sacchi 1987,
- 30 *Anal. Biochem.* 162, 156 isoliert, und 10 μg RNA, was dem Gesamt-RNA-Gehalt von $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen entspricht, mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Spuren 3 bis 12 der Fig. 1 B). Als Größenmarker mit authentischer Sequenz wurden gleichzeitig 10^9 in-vitro-Transkripte (ivtr.), die zu den $I_{389}/\text{NS2-3'}/\text{wt}$ oder den $I_{389}/\text{NS3-3'}/\text{wt}$ Replikon-RNAs korrespondieren, mit aufgetrennt (Spur 1 bzw. Spur 2). Die aufgetrennte RNA wurde auf Nylon-Membranen transferiert und mit radioaktiv markierter Plusstrang-spezifischer RNA-Sonde, die komplementär zu dem kompletten NPT-Gen und der HCV-IRES von Nukleotid 377 bis Nukleotid 1 war, hybridisiert. Die Positionen der HCV-spezifischen RNAs (Pfeile) und der 28S rRNA sind rechts von Spur 12 angegeben, die Größen (Anzahlen der Nukleotide) der RNA-Marker sind links von Spur 1 angegeben. Die RNA Marker-Fragmente enthalten HCV-Sequenzen und hybridisieren deshalb mit der Ribosonde (= RNA-Sonde). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 1 B dargestellt.
- 35 **[0068]** Mit Ausnahme des mit dem defekten HCV-Genom-Konstrukt transfizierten Klons 8-1, lieferten alle Zellklone homogene HCV-RNAs korrekter Länge (ca. 8640 Nukleotide im Fall des NS2-3' und ca. 7970 Nukleotide im Fall des NS3-3' Replikons). Dieser Befund ist ein Indiz dafür, daß die funktionalen Replikons bzw. die funktionalen HCV-Genom-Konstrukte die G418 Resistenz übertragen. Um auszuschließen, daß die G418 Resistenz auf eine Plasmid-DNA zurückzuführen ist, die in das Genom der Huh-7 Wirtszelle integriert ist und unter der Kontrolle eines zellulären Promotors transkribiert wird, wurde von jedem Klon die DNA mittels einer NPT-Gen-spezifischen PCR untersucht. Hierbei wurde aus den selektierten Huh-7-Zellklonen die DNA mittels Verdau mit Proteinase K (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1h, 37°C) in 10mMTris, pH7,5, 1mM EDTA, 0,5% SDS und anschließender Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Isopropanolpräzipitation isoliert. Das DNA-Präzipitat wurde in 10 mM Tris (pH 7,5) und 1 mM EDTA gelöst und 1 Stunde mit Rnase A inkubiert. Im Anschluß an eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol Präzipitation wurde 1 μg DNA, entsprechend $4 - 8 \times 10^4$ Zellen, mittels PCR unter Einsatz NPT-Gen-spezifischer Primer (5'-TCAAGACCGACCTG TCCGGTGGCC-3' und 5'-CTTGAGCCTGGCGAACAGTTCCGGC-3') analysiert und ein DNA-Fragment bestehend aus 379 Nukleotiden erzeugt. Die Spezifität des PCR-Produkts wurde mittels Southern Blot Verfahren nachgewiesen, wobei ein Digoxigenin-markiertes DNA Fragment eingesetzt wurde, das zu dem NPT-Gen korrespondiert. Als Positiv-Kontrollen (zum Nachweis etwa vorhandener kontaminierender Nukleinsäuren) wurde das PCR-Verfahren mit 10^7
- 50 Plasmid Molekülen oder 1 μg DNA aus einer BHK Zelllinie, die stabil mit einem Neomycin-Resistenz-Gen transfiziert war, durchgeführt, und als Negativ-Kontrolle wurde die PCR mit denselben Reagenzien aber ohne zugesetzte DNA durchgeführt.
- 55 Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Fig. 1 C dargestellt. Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Positiv-Kontrol-

len, Spur 13 repräsentiert die Negativ-Kontrolle. Die Zahlenangaben links der Spur 1 bezeichnen die Größe der Nukleotid-Marker-Moleküle. Außer in Klon 7-3 (Fig. 1C, Spur 3), der von Zellen nach Transfektion mit einem NS2-3' Replikon/NS2-3'HCV-Genom-Konstrukt stammt, und in Klon 8-1 (Fig. 1C, Spur 12), der von Zellen nach Transfektion mit einem defekten HCV-Genom-Konstrukt stammt, war in keinem Zellklon eine NPT-DNA nachweisbar. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz dafür, daß die G418 Resistenz der meisten Klone durch die replizierende HCV-RNA vermittelt wurde. Aber auch unabhängig von diesen Ergebnissen ist es unwahrscheinlich, daß HCV-RNAs mit korrekter Größe von integrierter Plasmid DNA erzeugt wird, denn die für die in-vitro-Transkription verwendeten Plasmide enthalten weder einen eukaryontischen Promotor noch ein Polyadenylierungssignal. Im Fall des Klons 7-3 ist die Resistenz deshalb höchst wahrscheinlich sowohl durch das HCV-RNA-Konstrukt bzw. die replizierende HCV-RNA als auch durch eine integrierte NPT DNA Sequenz vermittelt worden, während die Resistenz der Zellen von Klon 8-1 ausschließlich auf die integrierte Plasmid DNA zurückzuführen ist.

[0069] Um zu bestätigen, daß die G418 Resistenz von einer autonom replizierenden HCV-RNA vermittelt ist, wurde der Klon 9-13 (Fig. 1 B, Spur 11) weiteren Tests unterworfen. Klon 8-1, der integrierte Kopien des NPT-Gens trägt, wurde überall als Negativkontrolle eingesetzt. Mit dem Ziel, die Anwesenheit von NPT-DNA im Klon 9-13 rigoros auszuschließen, wurde eine PCR durchgeführt, die den Nachweis von < 1000 NPT-Gen-Kopien in ~ 40.000 Zellen erlaubt. Das Ergebnis dieser PCR ist in Fig. 2A dargestellt. Im einzelnen wurde bei dieser PCR wie folgt verfahren:

Es wurden jeweils 10^6 - 10^2 Plasmid Moleküle ($I_{377}/NS3-3'/wt$) entweder direkt (Spuren 7 - 11) oder nach Zugabe von jeweils 1 µg 9-13 DNA (Spuren 2 - 6) in dem Test eingesetzt. Die Spezifität der amplifizierten DNA Fragment wurde mittels Southern Blot unter Verwendung einer NPT-spezifischen Sonde bestimmt. Eine PCR ohne DNA-Sonde wurde als Negativ-Kontrolle durchgeführt (Spur 12).

Selbst mit dieser sensitiven Methode wurde in einem µg DNA des Zellklons 9-13 keine Plasmid DNA gefunden (Spur 1). Um die Menge an HCV Plus- und Minusstrang RNAs in diesen Zellen abzuschätzen, wurde eine Verdünnungsreihe von Gesamt-RNA mit dem Northern-Blot-Verfahren unter Verwendung einer Plus- oder Minusstrang-spezifischen radioaktiv markierten Ribosonde (= RNA-Sonde) analysiert. Hierfür wurden jeweils 8, 4 oder 2 µg Gesamt-RNA, die aus den Zellklonen 9-13 und 8-1 isoliert worden waren, parallel zu bekannten Mengen analoger in-vitro-Transkripte mit Plus- oder Minusstrang-Polarität (Kontroll-RNAs) im Northern-Blot-Verfahren analysiert und anschließend einer Hybridisierung unterworfen. Die Hybridisierung wurde mit einer Plusstrang-spezifischen Ribosonde, die das komplette NPT-Gen und die HCV-IRES abdeckte ('plusstrang', obere Bildtafel), oder mit einer Minusstrang-spezifischen RNA-Sonde, die zu der NS3-Sequenz komplementär war ('minusstrang', untere Bildtafel) durchgeführt. Die Pfeile markieren die Positionen von Replikon-RNA. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 2 B dargestellt.

Im Fall des Plusstrangs wurden ca. 10^5 Kopien/µg Gesamt-RNA nachgewiesen, was 1000 - 5000 HCV-RNA-Molekülen pro Zelle entspricht, während die Menge an Minusstrang-RNA 5- bis 10-fach niedriger war. Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, daß die Minusstrang RNA die replikative Zwischenform bzw. Zwischenkopie ist, die als Vorlage für die Synthese der Plusstrang Moleküle dient.

Da die Reaktion im wesentlichen von der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase katalysiert wird, sollte die Synthese der HCV-RNAs resistent gegen Dactinomycin sein, einem Antibiotikum, das selektiv die RNA-Synthese von DNA-Matrizen inhibiert, nicht jedoch die RNA-Synthese von RNA-Matrizen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Zellen mit [3H] Uridin in Anwesenheit von Dactinomycin inkubiert, die radioaktiv markierten RNAs extrahiert, mittels denaturierender Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines handelsüblichen Bio-Imagers unter Verwendung einer [3H] sensitiven Bildplatte analysiert. Hierfür wurden jeweils ca. 5×10^5 Zellen der Klone 9-13 und 8-1 mit 100 µ Ci [3H]Uridin für 16 Std. in Abwesenheit (-) oder Gegenwart (+) von 4 µg/ml Dactinomycin (Dact) inkubiert. Im Anschluß an diese Markierungsreaktion wurde die Gesamt-RNA präpariert und mittels Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. In den beiden ersten Spuren ist nur 1/10 der Gesamt-RNA dargestellt. Die radioaktiv markierte RNA wurden mit einem BAS-2500 Bio-Imager (Firma Fuji) sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 2 C dargestellt. In Übereinstimmung mit dem Inhibitor-Profil der NS5B Polymerase (Behrens et al., 1996, *EMBOJ.* 15, 12 und Lohmann et al., 1997, *J Virol.* 71, 8416) war die Replikation der HCV RNA nicht durch Dactinomycin beeinflusst worden, während die Synthese von zellulärer RNA gehemmt worden war. Um die Identität der viralen RNA zu bestätigen, wurde eine RT-PCR zur Reklonierung der replizierten Sequenzen durchgeführt. Die Sequenzanalyse der reklonierten RNA zeigte, daß die RNA in dem Klon 9-13 HCV-spezifisch ist und mit dem transkribierten Transkript des HCV-Konstrukts $I_{377}/NS3-3'/wt$ übereinstimmt.

[0070] Zur Analyse der viralen Proteine wurden die betreffenden Zellen zunächst metabolisch mit [^{35}S] Methionin/Cystein radioaktiv markiert, anschließend lysiert und danach die HCV-spezifischen Proteine mittels Immunopräzipitation aus den Zell-Lysaten isoliert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Fig. 3 A dargestellt. Im einzelnen wurde dabei wie folgt verfahren: Zellen der Zellklone 9-13 (wt) und 8-1 (Δ) waren durch Behandlung für 16 Stunden mit einer dem Fachmann geläufigen und im Handel erhältlichen Protein-Markierungs-Mischung (z.B. NEN Life Science) metabolisch radioaktiv markiert worden. Mittels Immunopräzipitation (IP) unter nicht-denaturierenden Bedingungen (z.B. nach Bartenschlager et al., 1995, *J. Virol.* 69, 7519) und unter Verwendung von drei verschiedenen Antiseren (3/4, 5A, 5B, gemäß Markierung am oberen Ende der Spuren 1 bis 12) waren die HCV-spezifischen Proteine vom Zell-Lysat abge-

trennt worden.. Die Immunokomplexe wurden mittels Tricine SDS-PAGE analysiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Um authentische Größenmarker zu erhalten, wurde das homologe Replikonstrukt I₃₇₇/NS3-3'/wt einer transienten Expression mit dem Vaccinia Virus T7-Hybrid System in Huh-7 Zellen unterworfen. Die dabei erhaltenen Produkte waren als Größenmarker (Spuren 7 - 9) parallel zu den Zellen der Klone 9-13 und 8-1 behandelt worden. Identifizierte HCV-Proteine sind am linken Rand von Spur 1 markiert, die Molekulargewichte (in Kilodalton) sind am rechten Rand von Spur 9 angegeben. Es ist anzumerken, daß das verwendete NS3/4-spezifische Antiserum ('3/4') bevorzugt mit NS4A und NS4B reagiert, was zu einer Unterrepräsentation von NS3 führt.

[0071] Alle viralen Antigene waren eindeutig nachweisbar und ihre apparenten Molekulargewichte zeigten keine Abweichungen gegenüber denjenigen, die nach transients Expression desselben bicistronischen HCV-RNA-Konstrukts in den ursprünglichen Huh-7 Zellen ermittelt wurden. Um die subzelluläre Verteilung der viralen Antigene zu bestimmen, wurde eine Immunofluoreszenz-Nachweisreaktion unter Einsatz von NS3- und NS5A-spezifischen Antisera durchgeführt (z.B. nach Bartenschlager et al., 1995, *J. Virol.* 69, 7519). Hierfür wurden Zellen der Klone 9-13 (wt) und 8-1 (Δ) 24 Std. nach dem Aussäen auf Deckgläsern mit Methanol/Azeton fixiert und mit polyklonalen NS3- oder NS5A-spezifischen Antisera inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem kommerziell erhältlichen FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-Antiserum sichtbar gemacht. Zur Unterdrückung unspezifischer Fluoreszenzsignale wurden die Zellen mit dem Farbstoff 'Evans Blue' gegengefärbt.

[0072] Die Ergebnisse dieses Nachweistests sind in Fig. 3 B dargestellt. Mit beiden Antisera war eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma nachweisbar. Die NS5A-spezifischen Antisera führten außerdem zu einer schwachen Zellkern-Fluoreszenz, was darauf hindeutet, daß zumindest kleine Mengen dieses Antigens auch zum Zellkern gelangen. Die generell dominierende Präsenz der viralen Antigene im Zytoplasma ist jedoch ein starkes Indiz dafür, daß die HCV-RNA Replikation im Zytoplasma stattfindet — so wie das bei den meisten RNA-Viren der Fall ist.

[0073] Diese Ergebnisse belegen klar, daß mit dem hier beschriebenen Versuchsansatz der Aufbau eines Zellsystems für das HCV gelungen ist, dessen Effizienz alles bisher bekannte um Größenordnungen übersteigt und erstmalig den Nachweis viraler Nukleinsäuren und Proteine mit konventionellen und bewährten biochemischen Methoden erlaubt. Erst diese Effizienz erlaubt überhaupt detaillierte Untersuchungen der HCV-Pathogenese, genetische Analysen verschiedener HCV-Funktionen und ein genaues Studium der Virus-/Wirtszellwechselwirkungen, wodurch sich neue Ansatzpunkte für die Entwicklung einer antiviralen Therapie definieren lassen.

Beispiel 3: Transfektion von Huh-7 Zellen mit HCV-Genomkonstrukten

[0074] Huh-7 Zellen werden wie in Beispiel 2 beschrieben transfiziert und selektioniert, wobei hier jedoch selektionierbare Konstrukte verwendet werden, die das vollständige Virusgenom enthalten. Die erhaltenen Zellklone werden analog dem Beispiel 2 mittels PCR auf Abwesenheit von HCV-DNA untersucht und die produktive Replikation der HCV-RNA wird danach mittels Northern Blot, [³H]Uridinmarkierung in Anwesenheit von Dactinomycin, Nachweis der viralen Proteine bzw. Antigene vorzugsweise mit Hilfe des Western Blots, der Immunopräzipitation oder der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Im Gegensatz zu den im Beispiel 2 beschriebenen Ansätzen lassen sich mit dem hier beschriebenen Konstrukt außerdem vollständige und sehr wahrscheinlich infektiöse Viren erhalten, was bei den dort (in Beispiel 2) beschriebenen Subgenomkonstrukten nicht der Fall ist. Diese Viren, die in der Zelle und dem Zellkulturüberstand vorhanden sind, werden beispielsweise mittels Ultrazentrifugation, Immunpräzipitation oder Fällung mit Polyethylenglykol konzentriert und alle exogenen, d.h. nicht im Viruspartikel eingebauten Nukleinsäuren werden mittels Inkubation mit Nukleasen (RNase, DNase, Mikrocococcusnuklease) verdaut. Auf diese Weise lassen sich alle kontaminierenden Nukleinsäuren, die nicht im schützenden Viruspartikel enthalten sind, entfernen. Die geschützte virale RNA wird nach Inaktivierung der Nukleasen, beispielsweise mittels Inkubation mit Proteinase K in einem SDS-haltigen Puffer durch Extraktion mit Phenol und Phenol/Chloroform isoliert und mittels Northern Blot oder RT-PCR unter Verwendung HCV-spezifischer Primer nachgewiesen. Auch in diesem Versuchsansatz ist die Kombination des beschriebenen HCV-Konsensusgenoms mit einem Selektionsmarker entscheidend für die effiziente Produktion von viraler RNA, viralem Protein und damit von HCV-Partikeln.

Beispiel 4: Herstellung und Anwendung eines HCV-RNA Konstrukts, bei dem das Resistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-Subgenom-Sequenz verbunden ist.

[0075] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß Beispiel 1 oder Beispiel 3 hergestellt, bei dem ein Antibiotikumresistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA-Sequenz verbunden ist. Solche Konstrukte sind in Fig. 7 schematisch dargestellt. Huh-7 Zellen werden wie in Beispiel 2 beschrieben mit diesem HCV-RNA-Konstrukt transfiziert. Nach der Transfektion in die Zellen erfolgt zunächst die Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum. In den dabei erhaltenen Zellklonen wird das inklonierte Ribozym aktiviert oder, im Fall eines Konstrukts, das eine Erkennungsstelle für ein Ribozym trägt, wird das Ribozym in die Zelle eingeschleust (z.B. mittels Transfektion eines Ribozymkonstrukts oder Infektion mit einem viralen Expressionsvektor, in den das entsprechende

Ribozym eingesetzt wurde). In beiden Fällen wird durch die ribozymvermittelte Spaltung das Resistenzgen von der HCV-RNA-Sequenz abgetrennt. Das Ergebnis ist im Fall des HCV-Genom-Konstrukts ein authentisches HCV-Genom ohne Resistenzgen, das zur Bildung authentischer infektiöser Viruspartikel befähigt ist. Im Fall des HCV-Subgenom-Konstrukts entsteht ein HCV-Replikon ohne Resistenzgen.

Beispiel 5: Kotransfektion eines HCV-RNA-Konstrukts mit einem separaten Luziferase-Transfektionskonstrukt

[0076] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß Beispiel 1 (A) oder Beispiel 3 oder Beispiel 4 hergestellt. Parallel dazu wird ein Transfektionskonstrukt hergestellt, welches das Luziferasegen umfaßt, wobei dieses Luziferasegen vermittels einer ersten Nukleotidsequenz, die für eine HCV-Protease- (z.B. NS3-Protease-) Spaltungsstelle kodiert, mit einer zweiten Nukleotidsequenz, die für ein anderes Protein oder einen Teil eines anderen Proteins kodiert, verbunden ist. HCV-RNA-Konstrukt und Transfektionskonstrukt werden in beliebige Wirtszellen, vorzugsweise Hepatomazellen, insbesondere Huh-7-Zellen, eingeschleust. Dies kann auf die in Beispiel 2 beschriebene Art und Weise geschehen. Das Produkt des modifizierten Luziferasegens ist ein Luziferase-Fusionsprotein, in dem die Luziferase auf Grund der Fusion mit dem Fremdanteil inaktiv ist. In transfizierten Zellen mit hoher HCV-Replikation wird das Fusionsprotein, das ja eine Schnittstelle für eine HCV-Protease enthält, gespalten und damit die aktive Form der Luziferase freigesetzt, die sich durch luminometrische Messung bestimmen läßt. Wird die Replikation des HCV-RNA-Konstrukts gehemmt, wird das Fusionsprotein nicht gespalten und keine aktive Luziferase freigesetzt. Infolgedessen ist die quantitative Bestimmung der Luziferase ein Maß für die Replikation des HCV-Subgenom-Konstrukts. Anstelle des Luziferasegens kann ebenso gut ein anderes Reportergen verwendet werden, das in analoger Weise modifiziert ist, so daß seine Expression von der Virusreplikation abhängt, obwohl dieses Reportergen nicht Bestandteil des HCV-Subgenom-Konstrukts ist. Es kann auch ein zelluläres Protein, welches durch die HCV-Proteine oder Nukleinsäure inaktiviert oder aktiviert wird, als sogenannter Surrogatmarker verwendet werden. In diesem Fall ist die Expression bzw. Aktivität dieses Surrogatmarkers ein Maß für die Replikation der viralen DNA.

Beispiel 6: Herstellung von HCV-Subgenom-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen zur Verwendung als leberzellspezifische Genfährten für die Gentherapie

[0077] Diese rekombinanten und selektionierbaren HCV-Subgenom-Konstrukte werden in trans-komplementierende Helferzelllinien transfiziert, d.h. in Zelllinien, die induzierbar oder konstitutiv die fehlenden Funktionen (beispielsweise die Strukturproteine) exprimieren. Zellklone, die ein funktionelles HCV-Subgenom-Konstrukt enthalten, lassen sich durch entsprechende Selektion etablieren. Die von der Wirtszelle exprimierten Virus-Strukturproteine erlauben die Bildung von Viruspartikeln, in die die RNA der HCV-Subgenom-Konstrukte eingeschleust wird. Das Ergebnis sind also virus-ähnliche Partikel, die ein erfindungsgemäßes HCV-Subgenom-Konstrukt einschließlich des inkorporierten Fremdgens enthalten und die dieses mittels Infektion auf andere Zellen übertragen können. Ein Beispiel für ein solches Konstrukt ist in Fig. 8 dargestellt. Es besteht auch die Möglichkeit, das hier beschriebene erfindungsgemäße HCV-Subgenom-Konstrukt mit integriertem Fremdgen direkt als Expressionsvektor einzusetzen. Dabei wird analog dem vorgenannten Verfahren vorgegangen, allerdings mit dem Unterschied, daß Zelllinien transfiziert werden, die keine trans-komplementierenden Faktoren exprimieren. In diesem Fall dient das HCV-Konstrukt also lediglich als Expressionsvektor.

Beispiel 7: Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Konstrukte

(A) Isolationsverfahren

[0078] Für die Bestimmung adaptiver Mutationen und die Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Konstrukte wurde wie folgt verfahren: Zellen wurden mit einem HCV-RNA-Konstrukt wie unter den Beispielen 1 und 2 beschrieben transfiziert und G418-resistente Zellklone hergestellt. Zur Bestimmung der Replikationskompetenz (darunter wird in diesem Zusammenhang die Anzahl G418-resistenter Zellklone verstanden, die pro Mikrogramm transfizierter HCV-RNA bzw. HCV-RNA-Konstrukt erhalten wird) wurde exemplarisch die Gesamt-RNA aus einem der Zellklone, genannt 9-13 (Fig. 1B, Spur 11) isoliert und die Menge der darin enthaltenen HCV-RNA mittels Northern-blot wie in Fig. 2 B beschrieben bestimmt. 10 Mikrogramm der Gesamt-RNA, die ca. 10^9 Moleküle HCV-RNA enthielt, wurde anschließend per Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust (Fig. 9). Parallel dazu wurden 10^9 in vitro Transkripte der analogen *neo*-HCV-RNA, die mit isolierter Gesamt-RNA aus naiven Huh-7 Zellen auf eine Gesamt-RNA-Menge von 10 µg aufgefüllt worden war, in naive Huh-7 Zellen transfiziert. Nach Selektion mit G418 wurde die Anzahl der Zellkolonien, ausgedrückt in 'colony forming units (cfu) pro Mikrogramm RNA' in den beiden Ansätzen bestimmt. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml G418 im Selektionsmedium betrug die Zahl der Kolonien, die mit der in der *isolierten* Gesamt-RNA enthaltenen HCV-RNA erhalten wurde, ca. 100.000 cfu pro Mikrogramm HCV-RNA. Dagegen wurden mit dersel-

ben Menge in vitro transkribierter HCV-RNA nur 30 - 50 Kolonien erhalten. Dieses Ergebnis belegt, daß die spezifische Infektiosität der HCV-RNA, die aus den Zellklonen isoliert wurde, ca. 1.000 - 10.000-fach höher ist als die Infektiosität der analogen in vitro Transkripte. Das methodische Vorgehen ist in Fig. 9 dargestellt.

[0079] Mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' wurde die HCV-RNA aus der Gesamt-RNA der 9-13 Zellen amplifiziert, die PCR-Amplifikate kloniert und zahlreiche Klone sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen dieser reklonierten RNAs mit der Sequenz der RNA, die ursprünglich in die naiven Huh-7 Zellen eingeschleust wurde ergab, daß die reklonierten RNAs zahlreiche Aminosäureaustausche besaßen, die über die gesamte HCV-Sequenz verteilt waren (Fig. 10). *Sfi*I-Fragmente dieser reklonierten Mutanten wurden im Austausch gegen das analoge *Sfi*I-Fragment des ursprünglichen Replikonkonstrukts in dieses eingeführt und RNAs der jeweiligen Mutanten wurden in naive Huh-7 Zellen eingeschleust. Nach Selektion mit G418 wurde dann für jede HCV-RNA-Mutante die Zahl der gebildeten Kolonien bestimmt. Während mit der Ausgangs-RNA nur 30 - 50 Kolonien pro Mikrogramm RNA erhalten wurde war die Koloniezahl bei zwei der reklonierten Varianten deutlich höher (Fig. 10). Im Fall der HCV-RNA-Konstrukte 9-13I und 9-13C betrug die spezifische Infektiosität 100 - 1.000 cfu pro Mikrogramm RNA und beim 9-13F Replikon sogar 1.000 - 10.000 cfu pro Mikrogramm RNA. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aminosäureaustausche in dem analysierten NS3-5B-Bereich der Mutanten 9-13I, 9-13C und insbesondere 9-13F zu einer deutlichen Erhöhung der Replikationskompetenz führten. Demgegenüber waren alle anderen HCV-RNA-Konstrukte (9-13 A, B, G, H und K) nicht mehr replikationskompetent, enthielten also letale Mutationen.

[0080] Zwecks Beantwortung der Frage, welche der Aminosäureaustausche im 9-13F-Konstrukt zur Steigerung der Replikation führten, wurden die Austausche einzeln oder in Kombination in das Ausgangs-HCV-RNA-Konstrukt eingeführt und die entsprechenden RNAs in naive Huh-7 Zellen eingeschleust. Das Ergebnis der Transfektionen mit diesen RNAs ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Daraus wird ersichtlich, daß im vorliegenden Beispiel die hohe Replikationskompetenz durch mehrere Mutationen bedingt ist. Den größten Beitrag leisten die Aminosäureaustausche in den HCV-RNA-Abschnitten NS5A und NS4B. Auch die einzelnen Austausche in der NS3-Region leisten einen Beitrag, der möglicherweise auf einem Synergismus dieser Einzelaustausche beruht.

Diese Befunde belegen, daß es durch die G418-Selektion der Zellen, die mit den *neo*-HCV-RNA-Konstrukten transfiziert wurden, zur Anreicherung solcher HCV-RNAs kam, die eine deutlich höhere Replikationskompetenz hatten. Mit dem hier beschriebenen Versuchsansatz lassen sich HCV-RNA-Konstrukte mit sehr unterschiedlicher Replikationseffizienz selektionieren. Je höher die Konzentration des Antibiotikums in dem Selektionsmedium ist, in/auf dem die HCV-RNA-Konstrukt-haltigen Zellen zwecks Selektion kultiviert werden, desto höher muß der Grad an adaptiven Mutationen und damit die Replikationseffizienz in den betreffenden HCV-RNA-Konstrukten sein, damit die Zellen auswachsen können. Werden die Selektionen mit niedrigeren Antibiotikum-Konzentrationen durchgeführt, können auch solche Zellen überleben und sich vermehren, die im Vergleich geringer adaptive Mutationen und eine weniger hohe Replikationseffizienz aufweisen.

Das bisher beschriebene HCV-RNA-Konstrukt 9-13F, das mehrere adaptive Mutationen enthielt, hatte eine erwiesenermaßen höhere Replikationseffizienz als die parentale HCV-RNA. Um HCV-RNAs mit noch höherer Replikation in Zellkultur zu erhalten, wurde die HCV-RNA, die in der Gesamt-RNA eines ausgewählten Zellklons enthalten war, mehrfach in naiven Huh-7 Zellen passagiert. Dieser ausgewählte Zellklon, genannt 5-15, wurde durch Transfektion mit dem HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/NS3-3' erhalten (Fig. 1). Er entspricht weitgehend dem Zellklon 9-13, der durch Transfektion mit einem HCV-RNA-Konstrukt hergestellt wurde, das eine um 22 Nukleotide kürzere HCV-IRES besaß (I₃₇₇/NS3-3'; Fig. 1). 10 Mikrogramm Gesamt-RNA, isoliert aus dem Zellklon 5-15, wurden mittels Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust und die Zellen einer Selektion mit 1 mg/ml G418 unterzogen. Aus einem der so erzeugten Zellklone wurde wiederum Gesamt-RNA isoliert, in naive Huh-7 Zellen transfiziert und analog selektioniert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Nach der vierten Passage wurde aus einem Zellklon die Gesamt-RNA isoliert und die *neo*-HCV-RNA mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I verdaut und in das *Sfi*I-restringierte Ausgangskonstrukt I₃₈₉/NS3-3' inseriert. Insgesamt wurden über 100 DNA-Klone erhalten und zunächst mittels Restriktionsverdau analysiert. In vitro transkribierte RNA von ca. 80 dieser Klone wurde jeweils in naive Huh-7 eingeschleust und einer Selektion mit 500mg/ml G418 unterzogen. Von den 80 untersuchten *neo*-HCV-RNA-Varianten erwiesen sich die allermeisten als replikationsdefekt. Bei zwei Mutanten, genannt 5.1 und 19, war die spezifische Infektiosität, ausgedrückt als 'colony forming units' pro Mikrogramm RNA, jedoch sehr deutlich erhöht (Tabelle 2). Durch mehrfache Passage der RNA in Zellkultur lassen sich offensichtlich HCV-RNAs herstellen, deren Replikationseffizienz aufgrund von Mutationen (sog. "adaptiven Mutationen") mehrere Größenordnungen höher ist als die der ursprünglich aus dem Patienten klonierten RNA.

(B) Modifikationsverfahren

[0081] Solche nach (A) erzeugten und identifizierten adaptiven Mutationen können in ein wenig replikationskompetentes HCV-RNA-Konstrukt übertragen werden und führen zu einer massiven Steigerung der Replikation dieses Konstrukts. Diese Steigerung ist so hoch, daß damit nachweislich HCV-RNAs in Zellkultur zur Replikation gebracht

werden können, die kein selektierbares Markergen mehr besitzen. Fig. 12 zeigt einen Vergleich der Replikationseffizienz von HCV-RNAs, die entweder der Ausgangssequenz oder den adaptierten Sequenzen 9-13F bzw. 5.1 entsprechen. Zwecks einfacher Messung wurde das *neo*-Gen entfernt und durch das Gen für die Luziferase ersetzt. Als Negativkontrolle diente wiederum ein HCV-RNA-Konstrukt, das auf Grund einer inaktivierenden Mutation der NS5B RNA-Polymerase replikationsdefekt war. Schon 24 Stunden nach der Transfektion erkennt man einen deutlichen Unterschied in der Luziferaseaktivität zwischen der defekten RNA und den 9-13F bzw. 5.1-Konstrukten während zwischen der defekten RNA (318 DN) und dem Ausgangs-RNA-Konstrukt (wt) das keine adaptiven Mutationen besaß, kaum ein Unterschied zu sehen war. Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurde die höchste Luziferaseaktivität und damit die höchste Replikation mit der 5.1-RNA erhalten. Diese Befunde belegen nicht nur die hohe Replikationseffizienz dieser RNA, sondern zeigen auch, daß es möglich ist, mit adaptierten HCV-RNA-Konstrukten ein Zellkultursystem aufzubauen, für das die Anwesenheit eines selektierbaren Gens nicht mehr notwendig ist. Eine zusammenfassende Übersicht der Nukleotid- und Aminosäureunterschiede zwischen dem Ausgangskonstrukt und den Mutanten 9-13F, 5.1 und 19 ist in Tabelle 3 gegeben.

Beispiel 8: Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Volllängengenome

[0082] In den Beispielen 1 bis 7 wurde stets eine subgenomische HCV-RNA verwendet, der die gesamte Strukturproteinregion von Core bis einschließlich p7 bzw. NS2 fehlte. Im vorliegenden Beispiel 8 wird gezeigt, daß es möglich ist, mit Hilfe der adaptierten NS3-5B-Sequenz ein HCV-Volllängengenom in Zellkultur zur Replikation zu bringen. Zu diesem Zweck wurde zunächst das SfiI-Fragment der gemäß Beispiel 7 hergestellten, hoch adaptierten HCV-RNA 5.1 in ein selektionierbares HCV-Volllängengenom transferiert (Fig. 12). Dieses HCV-Genom wurde in naive Huh-7 Zellen transfiziert und einer Selektion mit unterschiedlichen G418-Konzentrationen unterzogen. In Abhängigkeit von der Selektionsstärke (der G418-Konzentration) wurde eine unterschiedlich große Zahl an Zellklonen erhalten (Fig. 12 B). Im Vergleich dazu wurden mit dem unveränderten HCV-Volllängengenom, das keine adaptiven Mutationen enthielt, keine Kolonien erhalten, ebenso mit der Negativkontrolle, die auf Grund einer inaktivierenden Mutation in der NS5B RNA-Polymerase replikationsdefekt war. Zum Nachweis dafür, daß die so entstandenen Zellklone tatsächlich ein autonom replizierendes HCV-Volllängengenom enthielten, wurde Gesamt-RNA aus mehreren Zellklonen isoliert und mittels Northern-Blot analysiert. In allen Zellklonen war die Vollängen HCV-RNA eindeutig nachweisbar (Fig. 12). Damit ist eindeutig belegt, daß es mit Hilfe der an Zellkulturen adaptierten HCV-Sequenzen möglich ist, ein HCV-Volllängengenom herzustellen, das mit hoher Effizienz und autonom in einer Zelllinie repliziert, d.h. es können mit dem erfindungsgemäßen System auch adaptierte HCV-Volllängengenome hergestellt werden. Da dieser Klon darüber hinaus die vollständige HCV-Sequenz besitzt, also auch die für die Viruspartikelbildung notwendigen Strukturproteine, ist es mit diesem System möglich, große Mengen infektiöser Viruspartikel in Zellkulturen herzustellen. Zum Nachweis dieser Viren werden zellfreie Überstände von Zellen, die ein replizierendes HCV-Volllängengenom tragen, auf naive Huh-7 Zellen gegeben und die so infizierten Zellen einer Selektion mit G418 unterzogen. Jeder Zellklon, der unter diesen Bedingungen auswächst, geht auf eine infizierte Zelle zurück. Die Viren in den Zellkulturüberständen von Zellen, die ein replizierendes HCV-Volllängengenom besitzen, können aber auch mit verschiedenen im Stand der Technik bekannten Verfahren wie Ultrazentrifugation oder Mikrodialyse angereichert und gereinigt werden und dann zur Infektion naiver Zellen verwendet werden. Mit diesem Verfahren ist eindeutig gezeigt, daß mit dem erfindungsgemäßen HCV-Zellkultursystem zellkultur-adaptierte HCV-Volllängengenome hergestellt werden können, die mit hoher Effizienz in Zellen replizieren und infektiöse Viren produzieren. Diese können ebenfalls durch Infektion eines Versuchstiers, vorzugsweise dem Schimpansen, nachgewiesen werden.

Beispiel 9: Herstellung von HCV-Vollängen-Konstrukten und HCV-Subgenom-Konstrukten mit Reportergen.

[0083] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt hergestellt, bei dem anstelle des Antibiotikumresistenzgens ein Reportergen eingefügt wird (Fig. 13). Dabei kann die Replikation anhand der Menge bzw. der Aktivität des Reportergens bzw. Reportergenprodukts bestimmt werden. Das Reportergen ist vorzugsweise ein Gen aus der Gruppe der Luziferasegene, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasen), dem GFP-Gen (green fluorescence protein Gen), dem GUS-Gen (Glukuronidasen) oder dem SEAP-Gen (sezernierte alkalische Phosphatasen). Diese Reportergene bzw. deren Produkte, nämlich die entsprechenden Reporterproteine, können z.B. mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, colorimetrisch oder mit Hilfe immunologischer Methoden (z.B. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) bestimmt werden. Das Reportergen kann entweder von einer eigenen IRES exprimiert werden oder in Form eines Fusionsproteins, das entweder als solches aktiv ist oder mittels einer proteolytisch spaltbaren Aminosäuresequenz so mit einem HCV-Protein verbunden ist, daß es von einer zellulären oder viralen (HCV-)Protease von diesem abgespalten wird.

Beispiel 10: Herstellung von HCV-Vollängen-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen zur Verwendung als leberzellenspezifische Genfahre für die Gentherapie oder als Expressionsvektor.

[0084] Das Konstrukt (Fig. 14) wird in Zellen eingeschleust und führt dort zur Bildung von HCV-Viruspartikeln, die zur Infektion weiterer Zellen verwendet werden können. Da die Viruspartikel eine RNA mit einem Fremdgen enkapsidiert haben kann dieses in den so infizierten Zellen zur Produktion des von diesem Fremdgen kodierten Proteins benutzt werden. Zellen, die mit dem Konstrukt transfiziert wurden, exprimieren ebenfalls das Fremdgen.

Beispiel 11: Herstellung von monocistronischen HCV-RNA-Konstrukten, bei denen das Resistenzgenprodukt als Fusionsprotein mit dem HCV-Anteil exprimiert wird.

[0085] Für bestimmte Untersuchungen ist es von Vorteil, wenn das HCV-RNA-Konstrukt kein heterologes IRES-Element besitzt. Solche Untersuchungen sind beispielsweise die Bestimmung der Interferonresistenz. Wird eine Zelle, die ein HCV-RNA-Konstrukt besitzt, mit Interferon-alpha oder -beta inkubiert, kommt es zu einer Reduktion der Replikation der HCV-RNA. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus ist es notwendig, daß das HCV-RNA-Konstrukt keine heterologe IRES besitzt, da ansonsten nicht bestimmt werden kann, ob die Interferon-vermittelte Hemmung durch eine Hemmung der HCV-Replikation oder durch eine Hemmung der heterologen IRES vermittelt wird. Deshalb werden Konstrukte hergestellt, bei denen das Resistenzgen mit einem HCV-Protein fusioniert wird (Fig. 15). Entweder das Fusionsprotein ist als solches aktiv oder das Resistenzgenprodukt wird mittels einer proteolytisch spaltbaren Aminosäuresequenz so mit einem HCV-Protein verbunden ist, daß es von einer zellulären oder viralen (HCV-)Protease von diesem abgespalten wird.

Tabelle 1

Spezifische Infektiositäten (cfu/µg RNA) der HCV-RNA-Konstrukte mit adaptiven Mutationen, die bei der 9-13F Mutante gefunden und in das parentale HCV-RNA-Konstrukt I ₃₈₉ /NS3-3'/wt eingeführt wurden		
Aminosäureaustausch ¹	HCV-Protein	cfu/µg RNA ²
kein		30 - 60
1283 arg -> gly	NS3	200 - 250
1383 glu -> ala	NS3	30 - 60
1577 lys -> arg	NS3	30 - 60
1609 lys -> glu	NS3	160 - 300
(1283 arg -> gly + 1383 glu -> ala + 1577 lys -> arg + 1609 lys -> glu)	NS3	360 - 420
1936 pro -> ser	NS4B	500 - 1000
2163 glu -> gly	NS5A	1000-5000
2330 lys -> glu	NS5A	30 - 60
2442 ile -> val	NS5B	30 - 60
alle zusammen		5000

¹ Aminosäureaustausch im Polyprotein des HCV-Isolats Con-1 (EMBL-Genbank No. AJ238799); die Aminosäuren sind im Dreibuchstabenkode angegeben.

² Colony forming units (Anzahl der Zellklone) bei einer Selektion von 500µg/ml G418.

Tabelle 2

Spezifische Infektiositäten (cfu/μg RNA) des parentalen HCV-RNA-Konstrukts I ₃₈₉ /NS3-3'/wt und der Varianten 9-13C, 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19.		
Transfizierte ante	RNA-Variante	cfu/μg RNA ¹
	Wildtyp	30 - 50
	9-13 C	100 - 1.000
	9-13 I	100 - 1.000
	9-13 F	1.000 - 10.000
	5.1	50.000 - 100.000
	19	50.000 - 100.000

¹ Colony forming units (Anzahl der Zellklone) bei einer Selektion von 500μg/ml G418.

Tabelle 3: Nukleotid- und Aminosäureunterschiede zwischen dem parentalen HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/NS3-3'/wt und den Mutanten 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19

HCV Mutante	Nukleotidposition	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
9-13 I	3685	C > T	Pro > Leu
	4933	C > T	Thr > Met
	5249	T > C	-
	8486	C > T	-
	8821	G > A	Trp > stop
	8991	C > G	Arg > Gly
	9203	A > G	-
	9313	T > C	Phe > Ser
	9346	T > C	Val > Ala
9-13 F	3866	C > T	-
	4188	A > G	Arg > Gly
	4489	A > C	Glu > Ala
	4562	G > A	-
	4983	T > C	-
	5071	A > G	Lys > Arg
	5166	A > G	Lys > Glu
	6147	C > T	Pro > Ser
	6829	A > G	Glu > Gly
	7329	A > G	Lys > Glu
	7664	A > G	Ile > Val
	8486	C > T	-
	8991	C > G	Arg > Gly
NK5.1	4180	C > T	Thr > Ile
	4679	C > T	-

	4682	T > C	-
5	5610	C > A	Leu > Ile
	6437	A > G	-
	6666	A > G	Asn > Asp
10	6842	C > T	-
	6926	C > T	-
15	6930	T > C	Ser > Pro
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
20	NK19 3946	A > G	Glu > Gly
	4078	C > G	Ala > Gly
	4180	C > T	Thr > Ile
25	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
30	5958	A > T	Met > Leu
	6170	T > A	-
	6596	G > A	-
35	6598	C > G	Ala > Gly
	6833	C > T	-
	6842	C > T	-
40	6930	T > C	Ser > Pro
	7141	A > G	Glu > Gly
	7320	C > T	Pro > Ser
45	7389	A > G	Lys > Glu
	7735	G > A	Ser > Asn

[0086] Angegeben sind die Unterschiede der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zwischen der Ausgangs-HCV-RNA-Sequenz Con 1 (EMBL-Genbank No. AJ238799) und denen der zellkulturadaptierten HCV-RNAs. Die Zahlen
55 beziehen sich auf die Nukleotid- und Aminosäurepositionen des HCV-Isolats Con1.

EP 1 043 399 A2

SEQUENCE LISTING

5 <110> Bartenschlager, Ralf
 <120> Hepatitis C Virus cell culture system
 <130> ba-1
 <140> 199 15 178.4
 10 <141> 1999-04-03
 <160> 11
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 15 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus
 <400> 1
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgta ggaactactg 60
 20 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tcccttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccagta gtgttgggtc gcgaaagccc ttgttggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
 ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacg ggccgcgcat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 25 caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccttga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
 cgtggctggc caccaggggc gttccttggc cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
 gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
 ctccctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc 780
 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
 30 tggagccggg tcttgcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgccagc 900
 ccgaactggt ccgcaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgcttgcgc aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtgcccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
 ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
 cagaccacaa cggtttccct ctacggggat caattccgcc cctctccctc cccccccctc 1260
 35 aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggtgt cgtttgtcta tatgttattt 1320
 tccaccatat tgcctgtctt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
 acgagcattc ctagggtgtc ttccctcttc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
 gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
 tgcaggcagc ggaaccccc accctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
 taagatacac ctgcaaaggc ggcacaaccc cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
 40 gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
 gtacccattt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
 tgcaggttaa aaaacgtcta ggccccccga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
 cagcataata ccattggcac gaatcctaaa cctcaaagaa aaaccaaact taacaccaac 1860
 cgccgcccac aggaactgaa gttcccgggc ggtggtcaga tcgtcggtgg agtttacctg 1920
 45 ttgcccgcga ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
 caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccagggg tagggcctgg 2040
 gctcagcccg ggtacccctg gccctctat ggcaatgagg gcttgggggtg ggcaggatgg 2100
 ctctgtcac ccgtggctc tcggcctagt tggggcccca cgacccccg gcgtagggtcg 2160
 cgcaatttgg gtaaggtcat cgataccctc acgtgcggct tcgccgatct catggggtag 2220
 attccgctcg tcggcggccc cctagggggc gctgccaggg ccctggcgca tggcgtccgg 2280
 gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgctc cttttctatc 2340
 50 ttcccttttg ctttgcgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
 gtatccggag gttaccatgt cacgaacgac tgctccaaag caagcattgt gtatgaggca 2460
 gcggacatga tcatgcatac ccccggtgac gtgcctgcg ttccggagaa caactcctcc 2520
 cgctgctggg tagcgtcac tcccacgtc gcggccagga acgctagcgt cccactacg 2580
 acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt ggggcggctg ctctctgctc cgctatgtac 2640
 gtgggagatc tctgcggatc tgttttctc gtcgccagc tgttcacctt ctgcctcgc 2700

EP 1 043 399 A2

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

cgccacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacagggtcac 2760
 cgtatggcctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgag 2820
 ttactccgga tcccacaagc tgtcgtggat atggtggcgg gggccattg gggagtccca 2880
 gcgggacctg cctactatcc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
 ctctttccgg gcgttgacgg gggaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaaaccc 3000
 ctccgggatta cgtccctctt ttcacccggg tcatccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
 aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caaactggg 3120
 ttcccttgctg cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatggcc agagcgcatg 3180
 gccagctgca gcccacatga cgcgttcgct caggggtggg gggccatcac ttacaatgag 3240
 tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg caccocggcc gtgcggatc 3300
 gtaccccgcg cgcaggtgtg tgggtccagt tactccttca cccaagccc tgtcgtgggtg 3360
 gggacgaccg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
 ctgcttctta acaacacggg gccgcccga ggcaactggt ttggtgttac atggatgaat 3480
 agcactgggt tcaccaagac gtgcccgggg ccccggtgta acatcggggg gatcggaat 3540
 aaaacctga cctgcccacc ggactgcttc cggaagcacc ccgaggccac ttacaccaag 3600
 ttgggttcgg ggccttgggt gacacccaga tgccttggcc actaccata caggcttttg 3660
 cactaccctt gcactgtcaa ctttaccatc ttcaagggtta ggatgtacgt ggggggagtg 3720
 gagcacaggg tcgaagccgc atgcaattgg actcgaggag agcgttgtaa cctggaggag 3780
 agggacagat cagagcttag cccgctgctg ctgtctacaa cggagtggca ggtattgccc 3840
 tgttccctca ccacctacc ggctctgtcc actggtttga tccatctcca tcagaacgtc 3900
 gtggacgtac aatacctgta cggtataggg tcggcggttg tctcctttgc aatcaaatgg 3960
 gagtatgtcc tgttgcctct ccttcttctg gggacgcgc gcgtctgtgc ctgcttgttg 4020
 atgatgtctg tgatagctca agctagggcc gccctagaga acctgggtgt cctcaacggc 4080
 gcacccgtgg ccggggcgca tggcattctc tccctcctcg tgttcttctg tgcgtcctgg 4140
 tacatcaagg gcaggctggt cccctggggcg gcataatgcc tctacggcgt atggccgta 4200
 ctccctgtcc tgcctggcgt accaccaaga gcatacggca tggaccggga gatggcaga 4260
 tcgtgcggag gcgcggtttt cgtaggtctg atactcttga ccttgtcacc gcactataag 4320
 ctgttccctg ctaggctcat atgggtggtta caatatctta tcaccagggc cgaggcacac 4380
 ttgcaagtgt ggatccccc cctcaacgtt cggggggggc gcgatgccgt catcctctc 4440
 acgtgcgcga tccacccaga gctaactctt accatcacca aaatcttgct cgccatactc 4500
 ggtccactca tgggtgctcca ggctggtata accaaagtgc cgtacttctg gcgcgcacac 4560
 gggctcatc gtgcattgat cgtggtgcgg aaggttgctg ggggtcatta tgcctcaatg 4620
 gctctcatga agttggcgc actgacaggt acgtacgttt atgacctct caccctactg 4680
 cgggactggg cccacgcggg cctacgagac cttgcggtgg cagttagacc cgtcgtctc 4740
 tctgatattg agaccaaggt tatcacctgg ggggcagaca ccgcggcgtg tggggacatc 4800
 atcttggggc tgcctgtctc cgcctcgagg gggagggaga tacatctggg accggcagac 4860
 agccttgaag ggcagggggt gcgactcctc gcgcctatta cggcctactc ccaacagacg 4920
 cgaggcctac ttggctgcat catcactagc ctcacaggcc gggacaggaa ccaggtcgag 4980
 ggggaggtcc aagtgtgtct caccgcaaca caatctttcc tggcgacctg cgtcaatggc 5040
 gtgtgttga ctgtctatca tgggtccggc tcaaagaccc ttgcccggcc aaagggccca 5100
 atcacccaaa tgtacaccaa tgtggaccag gacctcgtc gctggcaagc gcccccggg 5160
 gcgcgttctc tgacaccatg cacctgcggc agctcggacc tttacttggc cagagggcat 5220
 gccgatgtca ttccgggtgc ccggcggggc gacagcaggg ggagcctact ctccccagg 5280
 cccgtctcct acttgaaggg ctcttcgggc ggtccactgc tctgcccctc ggggcacgct 5340
 ttgggcatct ttccgggtgc cgtgtgcacc cgagggttg cgaaggcggg ggactttgta 5400
 cccgtcgagt ctatggaaac cactatgcgg tcccgggtct tcacggacaa ctgcctccc 5460
 ccggccgtac cgcagacatt ccagggtggc catctacacg cccctactgg tagcggcaag 5520
 agcactaagg tgccggctgc gtatgcagcg caagggtata aggtgcttgt cctgaacctg 5580
 tccgtgcggc ccacctagg tttccggggc tatatgtcta aggcacatg tatcgacct 5640
 aacatcagaa ccggggtaag gaccatcacc acgggtgccc ccatcacgta ctccacctat 5700
 ggcaagtctc ttgcccaggg tgggtgtctc gggggcgcc atgacatcat aatatgtgat 5760
 gagtgcact caactgact gaccactatc ctgggcacg gcacagtcct ggaccaagcg 5820
 gagacggctg gagcgcgact cgtcgtgtc gccaccgcta cgctccggg atcgggtcac 5880
 gtgccacatc caaacatcga ggaggtggct ctgtccagca ctggagaaat ccccttttat 5940
 ggcaaagcca tccccatcga gaccatcaag ggggggaggc acctcatttt ctgccattcc 6000
 aagaagaaat gtgatgact cgcgcggaag ctgtccggcc tcggactcaa tgcgttagca 6060
 tattaccggg gccttgatgt atccgtcata ccaactagcg gagacgtcat tgtcgtagca 6120
 acggacgctc taatgacggg ctttaccggc gatttcgact cagtgtatga ctgcaatata 6180
 tgtgtcacc agacagtga cttcagcctg gaccgacct tcaccattga gacgacgacc 6240
 gtgccacaag acgcggtgtc acgctcgcag cggcgaggca ggactggtag gggcaggatg 6300
 ggcatttaca ggtttgtgac tccaggagaa cggccctcgg gcatgttcga ttccctggtt 6360
 ctgtgcgagt gctatgacgc gggctgtgtc tggtagcagc tcacgcccgc cgagacctca 6420
 gttaggttgc gggcttaccc aaacacacca ggggtgccc tctgccagga ccatctggag 6480
 ttctgggaga gcgtctttac aggcctcacc cacatagacg cccatttctt gtcccagact 6540
 aagcaggcag gagacaactt cccctacctg gtagcatacc aggtacgggt gtgcgccagg 6600
 gctcaggctc caccctcact gtgggaccaa atgtggaagt gtctcatagc gctaaagcct 6660

	acgctgcacg	ggccaacgcc	cctgctgtat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
	accacacacc	ccataaccaa	atacatcatg	gcatgcatgt	cggctgacct	ggaggtcgte	6780
	acgagcacct	gggtgctggt	aggcggagtc	ctagcagctc	tggccgcgta	ttgcctgaca	6840
5	acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgtccg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacagggaag	tcctttaccg	ggagtctgat	gagatggaag	agtgcgcctc	acacctccct	6960
	tacatcgaac	agggaaatgca	gctcgccgaa	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
	caaacagcca	ccaagcaagc	ggaggctgct	gctcccgtgg	tggaaatccaa	gtggcggacc	7080
	ctcgaagcct	tctggggcga	gcatatgtgg	aatttcatca	gccggatata	atatttagca	7140
	ggcttgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct	7200
	atcaccagcc	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
10	gccgcccaac	ttgctcctcc	cagcgctgct	tctgctttcg	taggcgcggg	catcgctgga	7320
	gcggtctgtg	gcagcatagg	ccttgggaag	gtgcttgggg	atattttggc	aggttatgga	7380
	gcaggggttg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggctatga	gcggcgagat	gccctccacc	7440
	gaggacctgg	ttaacctact	ccctgctatc	ctctcccctg	gcgccttagt	cgctcgggtc	7500
	gtgtgcgcag	cgatactcgg	tcggcacgtg	ggcccagggg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
	aaccggctga	tagcgttcgc	ttcgcgggtg	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgcct	7620
15	gagagcgacg	ctgcagcacg	tgctactcag	atcctctcta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
	ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgtccca	cgccatgctc	cggctcgtgg	7740
	tccaagctcc	tgccgcgatt	gccgggagtc	gtgttgactg	atttcaagac	ctggctccag	7800
	ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
	ggacatgtga	aaaacgggtc	catgaggatc	gtggggccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7920
	catggaacat	tcctccattaa	ccggtacacc	acggggccct	gcacgcccct	cccggcgcca	7980
20	aattatttcta	ggcgctgtg	gcgggtggct	gctgaggagt	acgtggaggt	tacgcgggtg	8040
	ggggatttcc	actacgtgac	gggcatgacc	actgacaacg	ttaaagtgcc	gtgtcaggtt	8100
	ccggccccct	aattcttcac	agaagtggat	gggggtcggg	tgacacaggta	cgctccagcg	8160
	tgcaaacccc	tcctacggga	ggaggtcaca	ttcctggtcg	ggctcaatca	atacctggtt	8220
	gggtcacacg	tcctatcgca	gcccgaacgg	gacgtagcag	tgctcacttc	catgctcacc	8280
	gacctctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggc	tggccagggg	atctcccccc	8340
25	tccttggcca	gctcatcagc	tagccagctg	tctgcgcctt	ccttgaaggc	aacatgcact	8400
	accgctcatg	actccccgga	cgctgacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcggcaggag	8460
	atgggcggga	acatcacccg	gctggagtca	gaaaataagg	tagtaatttt	ggactctttc	8520
	gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg	gaagtatccg	ttccggcgga	gatcctgcgg	8580
	aggtccaggga	aattccctcg	agcgatgccc	atatgggcac	gcccggatta	caacctcca	8640
	ctgttagagt	cctggaagga	cccggactac	gtccctccag	tggtacacgg	gtgtccattg	8700
	cgccctgccca	agccccctcc	gataccacct	ccacggagga	agaggacggg	tgtctgtcca	8760
30	gaatctacccg	tgtcttctgc	cttggcggag	ctcgccacaa	agaccttcgg	cagctccgaa	8820
	tcgtcggccg	tcgacagcgg	caaggcaacg	gcctctcctg	accagcccct	cgacgacggc	8880
	gacgcgggat	ccgacgttga	gtcgtactcc	tccatgcccc	cccttgaggg	ggagccgggg	8940
	gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttggctc	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9000
	gtctgctgct	cgatgtccta	caatgggaca	ggcgccctga	tcacgcccag	cgctcgggag	9060
	gaaaccaagc	tgcccatcaa	tgcaactgagc	aactctttgc	tcctgtacca	caacttggtc	9120
35	tatgctacaa	catctcgcag	cgcaagcctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacagactg	9180
	caggtccttg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaagcgcaa	ggcgtccaca	9240
	gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gcctgtaagc	tgacgcccc	acattcggcc	9300
	agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaaggac	gtccggaacc	tatccagcaa	ggccgttaac	9360
	cacatccgct	ccgtgtggaa	ggacttgctg	gaagacactg	agacaccaat	tgacaccacc	9420
	atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc	caaccagaga	agggggggcg	caagccagct	9480
	cgcccttatcg	tattcccaga	tttgggggtt	cgtgtgtgctg	agaaaatggc	cctttacgat	9540
40	gtggtctcca	ccctccctca	ggccgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctcct	9600
	ggacagcggg	tcgagtccct	ggtgaatgcc	tggaagcgga	agaaatgccc	tatgggcttc	9660
	gcataatgaca	cccgctgttt	tgactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tggtgaggag	9720
	tcaatctacc	aatgtttgtga	cttggccccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgtctaca	9780
	gagcggtctt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggctatcgc	9840
	cggtgcccgc	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttacttg	9900
45	aaggccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgtatgcgga	9960
	gacgaccttg	tcgttatctg	tgaagcggcg	gggacccaag	aggacgaggc	gagcctacgg	10020
	gccttcacgg	aggctatgac	tagatactct	gccccccctg	gggacccgcc	caaaccagaa	10080
	tacgacttgg	agttgataaac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtcgcgca	cgatgcactc	10140
	ggcaaaaggg	tgtactatct	cacccgtgac	cccaccaccc	cccttgccgg	qgctgcgtgg	10200
	gagacagcta	gacacactcc	agtcaattcc	tggtataggca	acatcatcat	gtatgcgccc	10260
	accttgtggg	caaggatgat	cctgatgact	catttcttct	ccatccttct	agctcaggaa	10320
50	caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10380
	gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	cattttcact	ccatagttac	10440
	tctccagggtg	agatcaatag	ggtggcttca	tgccctagga	aacttggggg	accgcccttg	10500
	cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgctaggc	tactgtccca	gggggggagg	10560

EP 1 043 399 A2

	getgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caaactcact	10680
	ccaatcccgg	ctgCGtccca	gttggattta	tccagctggg	tcgttgctgg	ttacagcggg	10740
5	ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc	cgaccccgct	ggttcacgtg	gtgcctactc	10800
	ctactttctg	taggggtagg	catctatcta	ctccccaacc	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
	ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
	tttttttttt	tttttttttc	tccttttttt	ttcctctttt	tttccttttc	tttccttttg	10980
	tggctccatc	ttagccctag	tcacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
	agagagtgc	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 043 399 A2

<210> 2
 <211> 8637
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

```

<400> 2
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgctcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gactacacog gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccog ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttggtgc gcgaaaggcc ttgtggtact gctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaagaaa aaccaaaggg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 480
ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcggcc ggttcttttt gtcaagaccg 540
acctgtccgg tgcctgaat gaactgcag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 600
cgacgggctg tccttgccga gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 660
tgctatttgg cgaagtgcgc gggcaggatc tcctgtcatc tcacctgct cctgccgaga 720
aagtatccat catggtgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
cattcgacca ccaagcgaat catcgcatcg agcgagcacg tactcgatg gaagccggtc 840
ttgtcgatca ggtgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 900
ccaggctcaa ggcgcgatg ccgcagcggc aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgctc 960
gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 1020
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc 1080
ttggcggcga atgggctgac cgttccctcg tgccttacgg tatcgccgct ccgattcgc 1140
agcgcatcgc ctcttatcgc ctcttgacg agttcttctg agtttaaaac gaccacaacg 1200
gtttccctct agcgggatca attccgcccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc 1260
cgaagccgct tggaaataag ccggtgtgcg tttgtctata tgttatttcc caccatattg 1320
ccgtcttttg gcaatgtgag ggcgccgaaa cctggccctg tcttcttgac gagcattcct 1380
aggggtcttt cccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt tgaatgctg gaaggaagca 1440
gttccctctg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag cgaccctttg caggcagcgg 1500
aacccccacg ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa 1620
tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg ccagaaaggc accccattgt 1680
atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgcctttacat gtgttttagtc gaaggttaaa 1740
aacgtctagg cccccgaac cacggggacg tggttttcct ttgaaaaaca cgataatacc 1800
aagcaccggg agatggcagc atcgtgcgga ggcgcgggtt tcgtaggtct gatactcttg 1860
acctgtcac cgcactataa gctgttccct ctagggtcca tatgggtggtt acaatatttt 1920
atcaccaggg ccgaggcaca cttgcaagtg tggatcccc ccctcaacgt tcgggggggc 1980
cgcgatcccg tcatctcctc acgtgcgcg atccaaccag agctaactct taccatcacc 2040
aaaatcttgc tcgccatact cggccactc atggtgctcc aggtcgttat aaccaaagt 2100
ccgtactctg tgcgcgcaca cgggtcatt cgtgcacgca tgcgtgtgcg gaaggttgc 2160
gggggtcatt agttccaaat ggctctcctg aagtggccg cactgacagg tacgtacgtt 2220
tatgaccatc tcacccact gcgggactgg gccacgcgg gcctacgaga ccttgcgtg 2280
gcagttgagc ccgtcgtctt ctctgatatg gagaccaagg ttatcaactg gggggcagac 2340
accgcggcgt gtggggacat catcttgggc ctgccgtct ccgcccgag ggggaggag 2400
atacatctgg gaccggcaga cagccttga ggcaggggt gccgactcct cgcgcctatt 2460
acggcctact cccaacagac gcgaggccta cttggctgca tcatcactag cctcacaggc 2520
cgggacagga accaggtcga gggggaggtc caagtgtct ccaccgcaac acaatcttcc 2580
ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg actgtctatc atggtgccgg ctcaaagacc 2640
cttgcgggcc caaaggggcc aatcacccaa atgtacacca atgtggacca ggacctcgtc 2700
ggctggcaag cgcgcccgcg ggcgcgttcc ttgacaccat gcacctgcgg cagctcggac 2760
ctttacttgg tcaagaggca tgcgcatgct attccggtgc gccggcgggg cgacagcagg 2820
gggagcctac tctccccag gcccgctccc tacttgaagg gctcttcggg cggteccact 2880
ctctgccctc cggggcacgc tgtgggcac tttcgggctg ccgtgtgcac ccgaggggtt 2940
gcgaaggcgg tggactttgt acccgtcgag tctatggaaa ccactatgcg gtcccccgtc 3000
ttcacggaca actcgtcccc tccggccgta ccgcagacat tccaggtggc ccatctacac 3060
gcccctactg gtagcggcaa gagcactaag gtgccggctg cgtatgcagc ccaagggtat 3120
aagtgcttgg tcctgaaccc gtccgtcgcc gccaccctag gtttcggggc gtatatgtct 3180
aaggcacatg gtagcgaccc taacatcaga accggggtaa ggaccatcac cacgggtgct 3240
cccatcacgt atccaccta tggcaagttt cttgcgcagc gtggttgctc tggggggcgc 3300
tatgacatca taatatgtga ttagtgccac tcaactgact cgaccactat cctgggcac 3360
ggcacagtcg tggaccaagc ggagacggct ggagcgcgac tcgtcgtgct cgccaccgct 3420
acgcctccgg ctgcggtcac cgtgccacat ccaaacatcg aggaggtggc tctgtccagc 3480
actggagaaa tcccccttta tggcaaagcc atccccatcg agaccatcaa gggggggagg 3540
    
```

55

5

10

20

25

30

35

40

45

50

55

```

cacctcattt tctgccattc caagaagaaa tgtgatgagc tcgccgcgaa gctgtccggc 3600
ctcggactca atgctgtagc atattaccgg ggccctgatg tatccgctcat accaactagc 3660
ggagacgtca ttgtcgtagc aacggacgct ctaatgacgg gctttaccgg cgatttcgac 3720
tcagtgtacg actgcaatac atgtgtcacc cagacagtcg acttcagcct ggacccgacc 3780
ttcaccattg agacgacgac cgtgccacaa gacgcggtgt cacgctcgca gcggcgaggc 3840
aggactggta ggggcaggat gggcattttac aggttttgtg ctccaggaga acggccctcg 3900
ggcatgttcg attcctcggg tctgtgcgag tgctatgacg cgggctgtgc ttggtagcag 3960
ctcacgcgcg ccgagacctc agttagggtt cgggcttacc taaacacacc agggttgccc 4020
gtctgccagg accatctgga gttctgggag agcgtcttta caggcctcac ccacatagac 4080
gccctttctt tgtcccagac taagcaggca ggagacaact tcccctacct ggtagcatat 4140
caggctacgg tgtgcgccag ggctcaggct ccacctccat cgtgggacca aatgtggaag 4200
tgtctcatac ggctaaagcc tacgctgcac gggccaacgc cctgctgtta taggctggga 4260
ggaaagccgg ccacatttcc taccacacac cccataacca aatacatcat ggcatgcatg 4320
tcggctgacc tggaggtcgt cacgagcacc tgggtgctgg taggcggagt cctagcagct 4380
ctggcccggt attgcctgac aacaggcagc gtggtcattg tgggcaggat catcttgtcc 4440
ggaaagccgg ccacatttcc taccacacac cccataacca aatgtggaag 4500
gagtgcgcct cacacctccc ttacatcgaa cagggaatgc agctgcgcga acaattcaaa 4560
cagaagccaa tcgggtgtgt gcaaacagcc accaagcaag cggagggtgc tgctccgtg 4620
gtggaatcca agtggcggag cctcgaagcc ttctgggcga agcatatgtg gaatttcac 4680
agcgggatac aatatttagc aggettgttc actctgctg gcaaccccg gatagcatca 4740
ctgatggcat tcacagcctc tatcaccagc ccgctcacca cccaacatac cctcctgttt 4800
aacatcctgg ggggatgggt ggccgcccaa ctgtgctctc ccagcgctgc ttctgtcttc 4860
ctaggcgccg gcatcgtctg agcgctgttt ggcagcatag gecttgggaa ggtgcttgtg 4920
gatatttttg cagggttatg agcagggggt gcaggcgctc tcgtggcctt taaggctatg 4980
agcggcgaga tgccctccac cgaggaacct gttaacctac tccctgtctat cctctccctt 5040
ggcgccctag tcgtcggggt cgtgtgcgca gcgatactgc gtcggcacgt ggcggcgagg 5100
gagggggctg tgcagtggat gaaccggctg atagcgtttc cttcgcgggg taaccacgtc 5160
tccccacgac actatgtgcc tgagagcgac gctgcagcac gtgtcactca gatcctctct 5220
agtctttacca tcactcagct gctgaagagg cttcaccagt ggatcaacga ggaactgtcc 5280
acgccatgct ccggctcgtg gctaagagat gtttgggatt ggatatgcac ggtgttgact 5340
gatttcaaga cctggctcca gtccaagctc ctgcccgcgt tgccgggagt ccccttcttc 5400
tcatgtcaac gtgggtacaa gggagtctgg cggggcgagc gcatcatgca aaccacctgc 5460
ccatgtggag cacagatcac cggacatgtg aaaaacggtt ccatgaggat cgtggggcct 5520
aggacctgta gtaacacgtg gcatggaaca ttccccatta acgcgtacac caccggcccc 5580
tgcaacgcct ccccgcgccc aaattattct agggcgctgt ggcgggtggc tgctgaggag 5640
tacgtggagg ttacgcgggt ggggattttc cactacgtga cgggcatgac cactgacac 5700
gtaaagtgcc cgtgtcagg tccggcccc gaattcttca cagaagtgga tgggtgtcgg 5760
ttgcacaggt acgctccagc gtgcaaaccc ctctacggg aggaggtcac attcctggtc 5820
ggcgccctag aatacctggt tgggtcacag ctcccattgc agcccgaaac ggaactgaga 5880
gtgtctactt ccattgtcac cgacctctcc cagattacgg cggagacggc taagcgtagg 5940
ctggccaggg gatctcccc ctccctggcc agctcatcag ctagccagct gctcgcctc 6000
tccttgaagg caacatgcac tactcggcat gactccccgg acgctgacct catcgaggcc 6060
aacctcctgt ggccggcagga gatgggagg gacatcacc gcgtggagt cagaaaatag 6120
gtagtaattt tggactcttt cgagccgctc caagcggagg aggatgagag ggaagtatcc 6180
gttccggcgg agatcctgcg gaggteccag aaattccctc gagcgatgcc catatgggca 6240
cgcccgattt acaaccctcc actgttagag tectggaagg acccggaacta cgtccctcca 6300
gtgggtacac ggtgtccatt gccgcctgcc aaggccccct cgataccacc tccacggagg 6360
aagaggacgg ttgtcctgtc agaattctacc gtgtcttctg ccttggcgga gctcgccaca 6420
aagacctteg gcagctccga atcgtcggcc gtcgacagcg gcacggcaac ggcctctcct 6480
gaccagccct ccgacgacgg cgacgcggga tccgacgttg agtcgtactc ctccatgccc 6540
ccccttgagg gggagccgg ggatcccgat ctacgagcag ggtcttggtc taccgtaagc 6600
gaggaggcta gtgaggacgt cgtctgtctg tcgatgtcct acacatggac aggcgcctg 6660
atcagcccat gcgctgcgga ggaacccaag ctgcccatac atgcactgag caactctttg 6720
ctccgtcacc acaacttggt ctatgctaca acatctcgca gcgcaagcct ggcgcagaag 6780
aaggtaacct ttgacagact gcaggtcctg gacgaccact accgggacgt gctcaaggag 6840
atgaaggcga aggcgtccac agttaaggct aaacttctat ccgtggagga agcctgtaag 6900
ctgacgcccc cacattcggc cagatctaaa tttggctatg gggcaaagga cgtccggaac 6960
ctatccagca aggcgttaa ccacatccgc tccgtgtgga aggaactgtc ggaagacact 7020
gagacacca ttgacaccac catcatggca aaaaatgagg tttctctcgt ccaaccagag 7080
aagggggggc gcaagccagc tcgccttatc gtattcccag atttgggggt tctgtgtgtc 7140
gagaaaaatg ccttttacga tgtgtctcc accctccctc aggcgtgat gggtcttcca 7200
tacggattcc aatactctcc tggacagcgg gtcgagttcc tggatgaatg ctggaaagcg 7260
aagaaaatgc ctatgggctt cgcataatgac acccgctgtt ttgactcaac ggtcactgag 7320
aatgacatcc gtgttgagga gtcaatctac caatgttgtg acttggcccc cgaagccaga 7380
caggccataa ggtcgtcac agagcggctt tacatcgggg gccccctgac taattctaaa 7440
ggcgagaact gcggctatcg ccggtgcgcg gcgagcgggt tactgacgac cagctcgggt 7500

```

EP 1 043 399 A2

	aataccctca	catgttactt	gaaggccgct	gcggcctgtc	gagctgcgaa	gctccaggac	7560
	tgcacgatgc	tcgtatgcgg	agacgacctt	gtcgttatct	gtgaaagcgc	ggggacccaa	7620
5	gaggacgagg	cgagcctacg	ggccttcacg	gaggctatga	ctagatactc	tgccccccct	7680
	ggggacccgc	ccaaaccaga	atacgacttg	gagttgataa	catcatgctc	ctccaatgtg	7740
	tcagtcgcgc	acgatgcac	tggcaaaagg	gtgtactatc	tcacccgtag	ccccaccacc	7800
	ccccctgcgc	gggctgcgtg	ggagacagct	agacacactc	cagtcaattc	ctggctaggc	7860
	aacatcatca	tgtatgcgcc	caccttggtg	gcaaggatga	tcctgatgac	tcatttcttc	7920
	tccatccttc	tagctcagga	acaacttgaa	aaagccctag	attgtcagat	ctacggggcc	7980
10	tgttactcca	ttgagccact	tgacctacct	cagatcattc	aacgactcca	tggccttagc	8040
	gcattttcac	tccatagtta	ctctccaggt	gagatcaata	gggtggcttc	atgcctcagg	8100
	aaacttgggg	taccgccctt	gcgagtctgg	agacatcggg	ccagaagtgt	ccgcgctagg	8160
	ctactgtccc	agggggggag	ggctgccact	tgtggcaagt	acctcttcaa	ctggggcagta	8220
	aggaccaagc	tcaaactcac	tccaatcccg	gctgcgtccc	agttggattt	atccagctgg	8280
	ttcgttgctg	gttacagcgg	gggagacata	tatcacagcc	tgtctcgtgc	ccgaccccg	8340
15	tggttcatgt	ggtgcctact	cctactttct	gtaggggtag	gcattctatct	actccccaac	8400
	cgatgaacgg	ggagctaaac	actccaggcc	aataggccat	cctgtttttt	tccctttttt	8460
	tttttctttt	tttttctttt	tttttctttt	tttttctttt	ctcctttttt	tttcctcttt	8520
	ttttcctttt	ctttcctttg	gtggctccat	cttagcccta	gtcacggcta	gctgtgaaag	8580
	gtccgtgagc	cgcttgactg	cagagagtgc	tgatactggc	ctctctgcag	atcaagt	8637
20							
25							
30							
35							
40							
45							
50							
55							

<210> 3
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

<400> 3
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcctgtcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gactacaccg gaattgccag 180
 gacgacgggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctccta gaccgtgcac catgagcacg aatccataac 360
 ctcaaaagaaa aaccaaactg aacaccaacg ggccgcccac gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
 cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgc actgaagcgg 660
 gaagggactg gctgtatttg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
 ctcttgcgca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcac acgcttgatc 780
 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgacgagca cgtactcgga 840
 tggaaagccg tcttgcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgccg 900
 ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtaga 1080
 ttgtcgaaga gcttgggcgc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc gcagcgatc gccttctatc gccttcttga cgagtctctc tgagtttaa 1200
 cagaccacaa cggtttccct ctacgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
 aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgttctgtca tatgttattt 1320
 tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
 acgagcattc ctagggtctc ttcccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgct 1440
 gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
 taagaggcagc ggaaccccc accctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
 ttgatacacac ctgcaaaggc ggcaacaacc cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
 gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
 gtaccccatc gtatgggac tgcctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
 tcgagggttaa aaaacgtcta ggccccccga accacgggga cgtggtttct cttgaaaaa 1800
 cagcataata ccattggcgc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
 tgcacatca ctacgctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
 gtctccaccg caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcggtg ttggactgtc 1980
 tatctagggt cggtctcaaa gaccttggc ggcccaagg gccaatcac ccaaatgtac 2040
 accaatgtgg accaggacct cgtcggttgg caagcgcccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
 ccattgcacct gcggcagctc ggacctttac ttggtcacga ggcatgccga tgtcattccg 2160
 gtgcgcccgc ggggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccgt ctctacttg 2220
 aagggtcttt cggcggtctc actgctctgc cctcggggc acgctgtggg catcttctg 2280
 gctgcgtgtg gcaccgagg ggttgcaag gcggtggact ttgtacccgt cgagtctatg 2340
 gaaaccacta tgccgtcccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
 acattccagg tggcccatct acacgcccct actggtagcg gcaagagcac taagggtccc 2460
 gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgctcgt cgccgccacc 2520
 ctagggtttc gggcgatat gtctaaggca catggtatcg accctaaccat cagaaccggg 2580
 gtaaggacca tcaccaaggc tgccccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttggc 2640
 gacgggtggt gctctggggc cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg cactcaact 2700
 gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtccctggac aagcggagac ggtcggagcg 2760
 cgactcgtcg tgcctgcacc cgctacgct cccggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
 atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccct tttatggcaa agccatccc 2880
 atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
 gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgtg tagcatatta ccggggcctt 3000
 gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaag 3060
 acgggcttta ccggcgattt cgactcagtg atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
 gtgcacttca gcctggaccc gaccttcacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcg 3180
 gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggtatgggcat ttacaggttt 3240
 gtgactccag gagaacggcc ctccggcatg ttcgattcct cgttctctgt cgagtctat 3300
 gacgcgggct gtgcttggtc cgagctcacg cccgccgaga cctcagttag gttcgggct 3360
 tacctaatac caccagggtt gcccgctgtc caggaccatc tggagttctg ggagagcgtc 3420
 tttacaggcc tcaccacat agacgcccac ttcttgtccc agactaagca ggcaggagac 3480
 aacttcccct acctggttag ataccaggct acgggtgtgc ccagggtcga ggctccacct 3540

55

	ccatcgtggg	accaaagtgt	gaagtgtctc	atacggctaa	agcctacgct	gcacggggcca	3600
	acgcccctgc	tgtataggct	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata	3660
	accaaataca	ctatggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcacgag	cacctgggtg	3720
5	ctggtaggcg	gagtcctagc	agctctggcc	gcgtattgcc	tgacaacagg	cagcgtggtc	3780
	attgtgggca	ggatcatctt	gtccggaaag	ccggccatca	ttcccagacg	ggaagtccct	3840
	taccgggagt	tcgatgagat	ggaagagtgc	gcctcacacc	tcctttacat	cgaacaggga	3900
	atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaag	gcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccaag	3960
	caagcggagg	ctgctgctcc	cgtggtggaa	tcceaagtg	ggaccctcga	agccttctgg	4020
	gcgaagcata	tgttgaattt	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggctt	gtccactctg	4080
	cctggcaacc	ccgcgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagccccctc	4140
10	accacccaac	ataccctcct	gttttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaacttgct	4200
	cctcccagcg	ctgcttctgc	tttcgttagg	gccggcatcg	ctggagcggc	tggtggcagc	4260
	ataggccctg	ggaaggtgct	tggtgatatt	ttggcagggt	atggagcagg	ggtggcaggc	4320
	gcgctcgtgg	cctttaaggt	catgagcggc	gagatgccct	ccaccgagga	cctggttaac	4380
	ctactccctg	ctatcctctc	ccctggcgcc	ctagtctctg	gggtcgtgtg	cgcagcgata	4440
	ctcgctcgcc	acgtgggccc	aggggagggg	gctgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4500
15	ttcgtctcgc	ggggttaacca	cgtctccccc	acgcactatg	tgctgagag	cgacgctgca	4560
	gcacgtgtca	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggcttcac	4620
	cagtggatca	acgaggactg	ctccacggca	tgctccggct	cgtggctaag	agatgtttgg	4680
	gattggatat	gcacggtggt	gactgatttc	aagacctggc	tcagctccaa	gctcctgccg	4740
	cgattgcccg	gagtcctcct	cttctcatgt	caacgtgggt	acaaggaggt	ctggcggggc	4800
	gaeggcatca	tgcaaaaccac	ctgccccatg	ggagcacaga	tcaccggaca	tgtgaaaaac	4860
20	ggttccatga	ggatcgtggg	gcctaggacc	tgtagtaaca	cgtggcatgg	aacattcccc	4920
	attaacgcgt	acaccacggg	cccctgcacg	ccctccccgg	cgccaaatta	ttctagggcg	4980
	ctgtggcggg	tggtctgtga	ggagtacgtg	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	5040
	gtgacgggca	tgaccaactga	caacgtaaag	tgcccggtgc	aggttccggc	ccccgaattc	5100
	ttcacagaag	tggtatgggt	gcggttgac	aggtacgtct	cagcgtgcaa	acccctccta	5160
	cgggagggag	tcacattcct	ggtcgggctc	aatacaatac	tggttgggtc	acagctccca	5220
	tgcgagcggc	aaacggagct	agcagtgtct	acttccatgc	tcaccgacc	ctccacatt	5280
25	acggcggaga	cggttaagcg	taggctggcc	aggggatctc	ccccctcctt	ggccagctca	5340
	tcagctagcc	agctgtctgc	gccttccttg	aaggcaacat	gcactaccgc	tcagtactcc	5400
	ccggacgctg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaaacat	5460
	acccgcgtgg	agtcagaaaa	taaggtagta	attttggact	cttccgagcc	gctccaagcg	5520
	gaggaggatg	agagggaagt	atccgttccg	gcggagatcc	tgccgaggtc	caggaaattc	5580
	cctcgagcga	tgcccatatg	ggcacgcccg	gattacaacc	ctccactgtt	agagtccctg	5640
30	aaggaccocg	actacgtccc	tcagtggtta	cacgggtgtc	cattggccgc	tgccaaaggc	5700
	cctccgatac	cacctccacg	gaggaaagg	acggttgtcc	tgtcagaatc	taccgtgtct	5760
	tctgccttgg	cggagctcgc	cacaagacc	ttcggcagct	ccgaatcgtc	ggccgtcgac	5820
	agcggcacgg	caacggcctc	tcctgacag	ccctccgacg	acggcgacgc	gggatccgac	5880
	gttgagtctg	actctcccat	gccccccctt	gagggggagc	cgggggatcc	cgatctcagc	5940
	gaagggtctt	ggtctaccgt	aagcaggagg	gctagttagg	acgtcgtctg	ctgctcgatg	6000
	tcctacacat	ggacaggcgc	cctgatcacg	ccatgcgctg	cggaggaaac	caagctgccc	6060
35	atcaatgcac	tgagcaactc	tttgcctcgt	caccacaact	tggtctatgc	tacaacatct	6120
	cgcagcgcaa	gcctgcggca	gaagaaggtc	acctttgaca	gactgcagggt	cctggacgac	6180
	cactaccggg	acgtgctcaa	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactt	6240
	ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctgacg	cccccaactt	cggccagatc	taaatttggc	6300
	tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6360
	tggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat	6420
	gaggttttct	gcgtccaacc	agagaagggg	ggccgcaagc	cagctcgcct	tatcgtattc	6480
40	ccagatttgg	gggttcgtgt	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtggt	ctccaccctc	6540
	cctcaggccg	tgatgggctc	ttcatacggg	ttccaatact	ctcctggaca	cggggtcgag	6600
	ttcctggtga	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccctatgg	gcttcgcata	tgacaccgcg	6660
	tggtttgact	caacggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt	6720
	tgtgacttgg	cccccggaagc	cagacaggcc	ataaggctgc	tcacagagcg	gctttacatc	6780
	ggggggcccc	tgactaattc	taaaaggcag	aactgcggct	atcgccgggtg	ccgcgcgagc	6840
45	ggtgtactga	cgaccagctg	cggtaatacc	ctcacatgtt	acttgaaggc	cgctgcggcc	6900
	tgctcagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgcgttt	6960
	atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gaggcgagcc	tacgggcctt	cacggaggct	7020
	atgactagat	actctgcccc	ccctggggac	ccgccccaaac	cagaatacga	cttggagttg	7080
	ataacatcat	gctctcccaa	tggtgcagtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aagggtgtac	7140
	tatctcacc	gtgacccccc	cacccccctt	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac	7200
	actccagtcg	attctctggct	aggcaacatc	atcatgtatg	cgccacctt	gtgggcaagg	7260
50	atgatcctga	tgactcattt	cttctccatc	cttctagctc	aggaaacaact	tgaaaaagcc	7320
	ctagattgtc	agatctacgg	ggcctgttac	tccattgagc	catttgacct	acctcagatc	7380
	attcaacgac	tccatggcct	tagcgcatct	tcactccata	gttactctcc	aggtgagatc	7440
	aatagggtgg	cttcatgcct	caggaaactt	ggggtaccgc	ccttgcgagt	ctggagacat	7500

EP 1 043 399 A2

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggetactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttgtggc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggctgcg	7620
5	tcccagttgg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccgacc	ccgctgggtc	atgtgggtgc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcattc	atctactccc	caaccgatga	acggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctggt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttcc	cttttttttc	ttttctttcc	tttgggtggc	ccatcttagc	7920
	cctagtcacg	gctagctgtg	aaaggtcctg	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
10	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 4
 <211> 7989
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

```

<400> 4
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgta ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccgt gagtacacc gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaaagaa aaccaaaggg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
cgcccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 480
catgtccgcg cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgcgc ggttcttttt gtcaagaccg 540
acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggtatcgc tggctggcca 600
cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga agggactggc 660
tgctattggg cgaagtgcgc gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 720
aagtatccat catggtgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatcgc gctacctgce 780
cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacgc agcgagcacg tactcggatg gaagccggct 840
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 900
ccaggctcaa ggccgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgctc 960
gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc 1020
tggtgtgggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 1080
ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgc tgccttacag tatcgccgct cccgattcgc 1140
agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agtttaaaac gaccacaacg 1200
gtttccctct agcgggatca attccgcccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc 1260
cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata tgttattttc caccatattg 1320
ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaag cctggccctg tcttcttgac gagcattcct 1380
aggggtcttt cccctctcgc caaggctctg tgaatgtcgt gaagggaagc 1440
gttcctctgg aagctctctg aagacaaaca acgtctgtag cgaccctttg caggcagcgg 1500
aaccccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacggt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa 1620
tggtctctct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg cccagaaggt accccattgt 1680
atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgcctttacat gtgtttagt c gaggttaaaa 1740
aacgtctagg cccccgaac cacggggacg tggttttcct ttgaaaaaca cgataatacc 1800
atggcgccct acgcgcctac acgcgaagcc tacttggtgc catcatcact 1860
agcctcacag gccgggacag gaaccaggtc gagggggagg tccaagtgtt ctccaccgca 1920
acacaatctt tcctggcgac ctgcgtcaat ggcgtgtgtt ggactgtcta tcatgggtgc 1980
ggctcaaaag ccccttgcgg cccaaagggc ccaatcaccc aatgttacac caatgtggac 2040
caggacctcg tcggctggca agcgcctccc ggggcgcggt ccttgacacc atgcacctgc 2100
ggcagctcgg accttactt ggtaacgagg catgccgatg tcattccggt gcgccggcgg 2160
ggcgacagca tggggagcct actctcccc agggccgctc ctaacttgaa gggctcttcg 2220
ggcgtccac tgctctgccc ctccgggcac gctgtgggca tctttcgggc tgccgtgtgc 2280
acccgagggg ttgcgaaggg ggtggacttt gtacccgctg agtctatgga aaccactatg 2340
cggctccccg tcttcacgga caactcgtec cctccggcgc tacgcagac attccaggtg 2400
gcccattcac acgcccctac tggtagcggc aagagcacta agtgccggc tgcgtatgca 2460
gcccaagggt ataagggtgt tgcctgaac ccgtccgtcg ccgccaccct aggtttcggg 2520
gcgtatatgt ctaaggcaca tggatcgcac cctaacatca gaaccggggt aaggaccatc 2580
accacgggtg cccccatcac gtaactccac tatggcaagt ttcttgccga cgtgtgttcg 2640
tctgggggct cctatgacat cataatatgt gatgagtgc actcaactga ctcgaccact 2700
atcctgggca tcggcacagt cctggaccaa gcggagacg ctggagcgcg actcgtcgtg 2760
ctcgccaccg ctacgcctcc gggatcggtc accgtgccac atccaaacat cgaggaggtg 2820
gctctgtcca gcactggaga aatccccctt tatggcaaa ccatcccat cgagaccatc 2880
aaggggggga ggcacctcat tttctgccat tccaagaaga aatgtgatga gctcgccgcg 2940
aagctgtccg gcctcggaat caatgctgta gcatattacc ggggccttga tgtatccgtc 3000
ataccaacta gcggagacgt cattgtcgta gcaacggacg ctctaatac gggctttacc 3060
ggcgatttcg actcagtgat cgactgcaat acatgtgtca cccagacagt cgacttcage 3120
ctggaccgga ccttcacccat tgagacgacg accgtgccac aagacgcggt gtcacgctcg 3180
cagcggcgag gcaggactgg taggggcagg atgggcattt acaggtttgt gactccagga 3240
gaacggccct cgggcatggt cgattcctcg gttctgtcgc agtgcctatga gcggggctgt 3300
gcttggtacg agctcacgcc cgccgagacc tcagttaggt tgcgggctta cctaaacaca 3360
ccagggttgc ccgtctgcga ggaccatctg gagttctggg agagcgtctt tacaggcctc 3420
accacatatg acgccatttt cttgtccag actaagcagg caggagacaa cttccctac 3480
ctggtagcat accaggctac ggtgtgcgcc agggctcagg ctccacctcc atcgtgggac 3540

```

55

	caaatgtgga	agtgtctcat	acggctaaag	cctacgctgc	acggggccaac	gcccctgtctg	3600
	tataggcttg	gagccgttca	aaacgaggtt	actaccacac	accccataac	caaatacatc	3660
	atggcatgca	tgteggctga	cctggagggtc	gtcacgagca	cctgggtgct	ggtagggga	3720
5	gtcctagcag	ctctggccgc	gtattgctctg	acaacaggca	gcgtgggtcat	tgtgggcagg	3780
	atcatcttgt	ccggaaagcc	ggccatcatt	cccgcagggg	aagtccttta	ccgggagttc	3840
	gatgagatgg	aagagtgcgc	ctcacacctc	ccttacatcg	aacagggaat	gcagctcgcc	3900
	gaacaattca	aacagaaggc	aatcggttg	ctgcaaacag	ccaccaagca	agcggaggct	3960
	gctgctcccg	tggtggaatc	caagtggcgg	accctcgaag	ccttctgggc	gaagcatatg	4020
	tggaaattca	tcagcgggat	acaatattta	gcaggcttgt	ccactctgcc	tggcaacccc	4080
10	gcgatagcat	cactgatggc	attcacagcc	tctatacca	gcccgtcac	cacccaacat	4140
	accctcctgt	ttaacatcct	ggggggatgg	gtggccgccc	aacttgctcc	tcccagcgct	4200
	gcttctgctt	tcgtaggcgc	cggcatcgct	ggagcggctg	ttggcagcat	aggccttggg	4260
	aaggtgcttg	tgataatttt	ggcaggttat	ggagcagggg	tggcaggcgc	gctcgtggcc	4320
	tttaaggtca	tgagcggcga	gatgcctcc	accgaggacc	tggttaacct	actcctgct	4380
	atcctctccc	ctggcgcctt	agtcgtcggg	gtcgtgtgcg	cagcgatact	gcgtcggcac	4440
	gtgggcccag	gggagggggc	tgtgcagtgg	atgaaccggc	tgatagcgtt	cgcttcggcc	4500
15	ggtaaccacg	tctccccac	gcactatgtg	cctgagagcg	acgctgcagc	acgtgtcact	4560
	cagatcctct	ctagtcttac	catcactcag	ctgctgaaga	ggcttcacca	gtggatcaac	4620
	gaggactgct	ccacgccatg	ctccggtctg	tggctaagag	atgtttggga	ttggatatga	4680
	acgggtgtga	ctgatttcaa	gacctggctc	cagtccaagc	tcctgcccg	attgccggga	4740
	gtcccctctt	tctcatgtca	acgtgggtac	aaggaggtct	ggcggggcga	cggcatcatg	4800
	caaaccacct	gccccatgtg	agcacagatc	accggacatg	tgaaaaaagg	ttccatgagg	4860
20	atcgtggggc	ctagacctcg	tagtaaacag	tgcatggaa	catcccccac	taacgcgtac	4920
	accacggggc	cctgcacgcc	ctccccggcg	ccaaattatt	ctagggcgct	gtggcgggtg	4980
	gctgctgagg	agtacgtgga	ggttacgcgg	gtgggggatt	tcactacgt	gacgggcacg	5040
	accactgaca	acgtaaagtg	cccgtgtcag	gttcggggcc	ccgaattctt	cacagaagtg	5100
	gatggggtgc	ggttgacacg	gtacgctcca	gcgtgcaaac	ccctcctacg	ggaggaggtc	5160
	acattctctg	tcgggctcaa	tcaatacctg	gttgggtcac	agctcccatg	cgagcccgaa	5220
	ccggacgtag	cagtgtcac	accgacctct	accgacctct	ccacattac	ggcggagacg	5280
25	gctaagcgta	ggctggccag	gggatctccc	ccctccttgg	ccagctcatc	agctagccag	5340
	ctgtctcgcc	cttccttgaa	ggcaacatgc	actaccogtc	atgactcccc	ggacgctgac	5400
	ctcatcgagg	ccaacctcct	gtggcggcag	gagatgggag	ggaacatcac	cccgctggag	5460
	tcagaaaata	aggtagtaat	tttggaactct	ttcgagcccg	tccaagcggg	ggaggatgag	5520
	agggaaagtat	ccgttcgggc	ggagatcctg	cggagggtcca	ggaatttccc	tcgagcgatg	5580
	cccatatggg	cacgccccga	ttacaacctc	ccactgttag	agtcctggaa	ggaccgggac	5640
30	tacgtgcctc	cagtgtgaca	tggtgttcca	ttgcgcgctg	ccaaggcccc	tccgatacca	5700
	cctccacgga	ggaagaggac	ggttgtctctg	tcagaatcta	ccgtgtcttc	tgcttggcgg	5760
	gagctcgcca	caaagacctt	cggcagctcc	gaatcgtcgg	ccgtcgacag	cggcacggca	5820
	acggcctctc	ctgaccagcc	ctccgacgac	ggcgacgcgg	gatccgacgt	tgatctgtac	5880
	tcctccatgc	cccccttga	gggggagccg	ggggatcccg	atctcagcga	cgggtcttgg	5940
	tctaccgtaa	gcgaggaggc	tagtgaggac	gtcgtctgct	gctcgatgtc	ctacacatgg	6000
	acaggcgccc	tgatcacgcc	atgcgctgcg	gaggaaacca	agctgcccac	caatgcaact	6060
35	agcaactctt	tgctccgtca	ccacaacttg	gtctatgcta	caacatctcg	cagcgcaagc	6120
	ctgcggcaga	agaaggtcac	ctttgacaga	ctgcaggctc	tggaacgaca	ctaccgggac	6180
	gtgctcaagg	agatgaaggg	gaaggcgctc	acagttaagg	ctaaacttct	atccgtggag	6240
	gaagcctgta	agctgacgcc	cccacattcg	gccagatcta	aatttggtcta	tgggggcaag	6300
	gacgtccgga	acctatccag	caaggccgtt	aaccacatcc	gctccgtgtg	gaaggacttg	6360
	ctggaagaca	ctgagacacc	aattgacacc	accatcatgg	caaaaaatga	ggttttctgc	6420
40	gtccaaccag	agaagggggg	ccgcaagcca	gctcgcccta	tcgtattccc	agatttgggg	6480
	gttcgtgtgt	gcgagaaaat	ggccctttac	gatgtggtct	ccacctccc	tcaggccgtg	6540
	atgggctctt	catacgatt	ccaatactct	cctggacagc	gggtcgagtt	cctggtgaat	6600
	gcctggaaag	cgaagaaatg	ccctatgggc	ttcgcatag	acacccgctg	ttttgactca	6660
	acggctcactg	agaatgacat	ccgtgttgag	gagtcfaatc	accaatgttg	tgacttggcc	6720
	cccgaagcca	gacaggccat	aagtgctctc	acagagcggc	tttcatatcg	gggccccctg	6780
	actaattctc	aagggcagaa	ctgcggctat	cgcgggtgcc	gcgcgagcgg	tgactgacg	6840
45	accagctcg	gtaataccct	cacatgttac	ttgaaggccg	ctgcggcctg	tcgagctgcg	6900
	aagctccagg	actgcacgat	gctcgtatgc	ggagacgacc	ttgtcgttat	ctgtgaaagc	6960
	gcggggaccc	aagaggacga	ggcgagccta	cgggccttca	cggaggctat	gactagatac	7020
	tctgcccccc	ctggggaccc	gccccaaaca	gaatacgact	tggagttgat	aacatcatgc	7080
	tcctccaatg	tgtcagtcgc	gcacgatgca	tctggcaaaa	gggtgtacta	tctcaccctg	7140
	gacccccaca	cccccttgc	gcgggctgcg	tgggagacag	ctagacacac	tccagtcaat	7200
	tcctggctag	gcaacatcat	catgtatgcg	cccaccttgt	gggcaaggat	gacccctgat	7260
50	actcatttct	tctccatcct	tctagctcag	gaacaacttg	aaaaagccct	agattgtcag	7320
	atctacgggg	cctgttactc	cattgagcca	cttgacctac	ctcagatcat	tcaacgactc	7380
	catggcctta	gcgcattttc	actccatagt	tactctccag	gtgagatcaa	taggggtggct	7440
	tcatgcctca	ggaaacttgg	ggtaccgccc	ttgcgagtct	ggagacatcg	ggccagaagt	7500

EP 1 043 399 A2

	gtccgcgcta	ggctactgtc	ccaggggggg	agggctgcca	cttgtggcaa	gtacctcttc	7560
	aactgggcag	taaggacca	gctcaaaactc	actccaatcc	cggctgcgtc	ccagttggat	7620
5	ttatccagct	ggttcgttgc	tggttacagc	gggggagaca	tatatcacag	cctgtctcgt	7680
	gcccgaaccc	gctggttcat	gtggtgccta	ctcctacttt	ctgtaggggt	aggcatctat	7740
	ctactcccca	accgatgaac	ggggagctaa	acactccagg	ccaataggcc	atcctgtttt	7800
	tttccctttt	tttttttctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttctcctttt	7860
	tttttctctt	ttttttcctt	ttctttcctt	tgggtggctcc	atcttagccc	tagtcacggc	7920
	tagctgtgaa	aggcccggtga	gccgcttgac	tgcagagagt	gctgatactg	gcctctctgc	7980
10	agatcaagt						7989

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 5
 <211> 8649
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

<400> 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgctcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggg gactacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tccctttctg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaaagaa aaccaaactg aacaccaacg ggccgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcgagtgcc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgcca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacatg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgctgat caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcggcg 900
ccgaactggt cgccaggtcc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttgggcgc gaatgggtcg accgcttcc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccattc gcagcgcatc gccttctatc cgagttcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cgggttccct ctacgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagctatc ctagggtgtc ttcccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgccagcgag ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaggg ggcacaaccc cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaa 1680
gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgca accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cagcataata ccatggaccg ggagatggca gcatcgtgcg gaggcgcggt ttctgtaggt 1860
ctgatactct tgacctgtc accgcaactat aagctgttcc tcgctaggct catatggtgg 1920
ttacaatatt ttatcaccag ggccgaggca cacttgcaag tgtggatccc cccctcaac 1980
gttcgggggg gcgcgcatgc cgtcatcctc ctacagtgcg cgatccacc agagctaata 2040
tttaccatca ccaaaatctt gctcgccata ctcggtccac tcatggtgct ccaggctggt 2100
ataaccaaa gtcgctactt cgtgcgcgca cacgggtcca ttctgtcatg catgtggtg 2160
cggaaggttg ctgggggtca ttatgtccaa atggctctca tgaagtggc cgcactgaca 2220
ggtacgtacg tttatgacca tctaccccca ctgcgggact ggcccaacgc gggcctaaca 2280
gaccttgccg tggcagttga gcccgctcgtc ttctctgata tggagaccaa ggttatcacc 2340
tgggggggcag acaccgcggc gtgtggggac atcatcttgg gcctgcccgt ctccgccgcg 2400
aggggggaggg agatacatct gggaccggca gacagccttg aagggcaggg gtggcgactc 2460
ctcgccgcta ttacggccta ctcccaacag acgcgaggcc tacttggctg catcatcact 2520
agcctcacag gccgggacag gaaccaggtc gagggggagg tccaagtggg ctccaccgca 2580
acacaatctt tctggcgac ctgcgtcaat ggctgtgtgt ggactgtcta tcatggtgcc 2640
ggctcaaaga ccttgccgg cccaaagggc ccaatcacc aaatgtacac caatgtggac 2700
caggacctcg tcggctggca agcgcccccc gggcgcggtt ccttgacacc atgcacctgc 2760
ggcagctcgg accttactt ggtcacagg catgcgatg tcatccggg gcgcggcgcg 2820
ggcgacagca gggggagcct actctcccc aggccgtct cctacttgaa gggtctctcg 2880
ggcgtgccac tgctctgccc ctcggggcac gctgtgggca tcttccgggc tgccgtgtgc 2940
acccgagggg ttgcgaaggg ggtggaactt gtaccgtcg agtctatgga aacctatg 3000
cggctcccgg tcttcacgga caactcgtcc cctccggccg taccgcagac attccagggt 3060
gcccattctac acgcccctac tggtagcggc aagagcacta aggtgccggc tgcgtatgca 3120
gcccagggtg ataaggtgct tgctctgaac cgtccgtcg ccgccaccct aggtttcggg 3180
gcgtatatgt ctaaggcaca tggatcgac cctaacaatc gaaccggggt aaggaccatc 3240
accacgggtg ccccatcac gtaactccac tatggcaagt ttcttgccga cgggtgtgtc 3300
tctgggggcy cctatgacat cataatatgt gatgagtgc actcaactga ctcgaccact 3360
atctggggca tcggcacagt cctggaccaa gcggagacgg ctggagcgcg actcgtcgtg 3420
ctcgccaccg ctacgcctcc gggtacggtc accgtgccac atccaaacat cgaggaggtg 3480
gctctgtcca gcaactggaga aatccccctt tatggcaaa ccatccccat cgagaccatc 3540

```

EP 1 043 399 A2

5 aaggggggga ggcacctcat tttctgccat tccaagaaga aatgtgatga gctcgcgcgc 3600
 aaagtgtccg gcctcggact caatgtctga gcatattacc ggggccttga tgtatccgtc 3660
 ataccaacta gcggagacgt cattgtcgtg gcaacggacg ctctaattgac gggcctttacc 3720
 ggcgatttcg actcagtgat cgactgcaat acatgtgtca ccagacaggt cgacttcagc 3780
 ctggaccgga ccttcacccat tgagacgacg accgtgccac aagacgcggt gtcacgctcg 3840
 cagcggcgag gcaggactgg taggggcagg atgggcatlt acaggtttgt gactccagga 3900
 gaacggccct cgggcatgtt cgattcctcg gttctgtgag agtgctatga cggggctgt 3960
 gcttggtacg agctcacgcc cgccgagacc tcagttaggt tgcgggctta cctaaacaca 4020
 ccagggttgc ccgtctgcca ggaccatctg gatttctggg agagcgtctt tacaggcctc 4080
 10 accacacag acgcccattt ctgttcccag actaagcagg caggagacaa cttcccctac 4140
 ctggttagcat accaggctac ggtgtgccc agggctcagg ctccacctcc atcgtgggac 4200
 caaatgtgga agtgtctcat acggctaaag cctacgctgc acgggccaac gccctgtctg 4260
 tataggctgg gagccgttca aaacgaggtt actaccacac acccataaac caaatacatc 4320
 atggcatgca tgtcggctga cctggagggtc gtcacgagca cctgggtgct ggtaggcgga 4380
 gtccatagcag ctctggccgc gtattgcctg acaacaggca gcgtggtcat tgtgggcagg 4440
 atcatcttgt ccggaagacc ggccatcatt ccgacaggg aagtccttta ccgggagttc 4500
 15 gatgagatgg aagagtgcgc ctcacacctc ccttacatcg aacagggaat gcagctcgcc 4560
 gaacaattca aacagaaggc aatcgggttg ctgcaaacag ccaccaagca agcggaggct 4620
 gctgctcccg tgggtggaatc caagtggcgg accctcgaag ccttctgggc gaagcatatg 4680
 tgggaatttca tcagcgggat acaatattta gcaggcttgt ccactctgcc tggcaacccc 4740
 gcgatagcat cactgatggc attcacagcc tctatacca gcccgctcac caccacat 4800
 accctcctgt ttaacatcct ggggggatgg gtggccgccc aacttgctcc tccagcgt 4860
 gcttctgctt tcgtaggcgc cggcatcgct ggagcggctg ttggcagcat aggccttggg 4920
 20 aaggtgcttg tggatatttt ggcagggtat ggagcagggg tggcagggcg gctcgtggcc 4980
 tttaagggtca tgagcggcga gatgccctcc accgaggacc tggttaacct actcctgct 5040
 atcctctccc ctggcgcctt agtcgtcggt gtctgtgctg cagcgatact gcgtcggcac 5100
 gtgggcccag gggagggggc tgtgcagtgg atgaaccggc tgatagcgtt cgcttcgctg 5160
 ggtaaacacg tctccccac gcactatgtg cctgagagcg acgtcgcagc acgtgtcact 5220
 cagatcctct catctcttac ctgctgaaga ggcttcacca gtggatcaac 5280
 25 gaggactgct ccacgccatg ctccgctcgc tggctaagag atgtttggga ttggatatgc 5340
 acggtggttga ctgatttcaa gacctgggtc cagtcacaag tctgtccgcg attgccggga 5400
 gtccccctt ctcatgttca acgtgggtac aagggagtct ggccggggcg cggcatcatg 5460
 caaacaccct gcccatgtgg agcacagatg accggacatg tgaaaaacgg tccatgagg 5520
 atcgtggggc ctaggacctg tagtaacacg tggcatggaa cattccccat taacgcgtac 5580
 accacggggc cctgcacgcc ctccccggcg ccaaattatt ctaggggcgt gtggcgggtg 5640
 gagctcgcca caaagacctt cggcagctcc gtgggggatt tccactacgt gacgggcatg 5700
 30 accactgaca acgtaaaagt cccgtgtcag gttccggccc ccgaattctt cacagaagtg 5760
 gatggggtgc ggttgacag gtacgctcca gcgtgcaaac ccctcctacg ggaggaggtc 5820
 acattcctgt tccggctcaa tcaatacctg gttgggtcac agctcccatg cgagcccgaa 5880
 ccggacgtag cagtgtcac tccatgctc accgacccct cccacattac ggccgagacg 5940
 gctaagcgta ggttgccag gggatctccc cctccttggt ccagctcatc agctagccag 6000
 ctgtctgcgc ctctcctgaa ggcaacatgc actaccgctc atgactcccc ggacgctgac 6060
 35 ctcatcgagg ccaacctcct gtggcggcag gagatggcg ggaacatcac ccgctggag 6120
 tcagaaaata aggtagtaat tttggactct ttcgagccgc tccaagcgga ggaggatgag 6180
 agggaagtat ccgttccggc ggagatcctg cggaggtcca ggaaattccc tcgagcgatg 6240
 cccatatggt cagcccgga ttacaacct cactgttag agtccggaa ggaccggac 6300
 tacgtccctc cagtgttaca cgggtgtcca ttgccgctg ccaaggcccc tccgatacca 6360
 cctccacgga ggaagaggac ggtgtctctg tcagaatcta ccgtgtctt tgccttggcg 6420
 40 gagctcgcca caaagacctt cggcagctcc gaatcgtcgg ccgtcgacag cggcacggca 6480
 acggcctctc ctgaccagcc ctccgacgac ggcgacgcgg gatccgacgt tgagtctgac 6540
 tctccatgc ccccccttga ggggagccg ggggatcccg atctcagcga cgggtcttgg 6600
 tctaccgtaa gcgaggaggc tagtgaggac gtcgtctgct gctcgatgct ctacacatgg 6660
 acaggcgccc tgatcacgcc atgcgctgag gaggaaacca agctgcccac caatgcactg 6720
 agcaactctt tgcctccgtc ccacaacttg gtctatgcta caacatctcg cagcgcaagc 6780
 ctgcggcaga agaaggtcac ctttgacaga ctgcaggctc tggacgacca ctaccggagc 6840
 45 gtgctcaagg agatgaaggc gaaggcgctc acagttaagg ctaaaactct atccgtggag 6900
 gaagcctgta agctgacgcc ccacattcgc gccagatcta aatttggcta tggggcaaag 6960
 gacgtccgga acctatccag caagggcgtt aaccacatcc gctccgtgtg gaaggacttg 7020
 ctggaagaca ctgagacacc aattgacacc accatcatgg caaaaaatga ggttttctgc 7080
 gtccaaccag agaagggggg ccgcaagcca gctcgcctta tcgtattccc agatttgggg 7140
 gttcgtgtgt gcgagaaaaa gggcctttac gatgtggtct ccaacctccc tcaggccgtg 7200
 50 atgggctctt catacggaat ccaatactct cctggacagc gggtcgagtt cctggtgaat 7260
 gcttggaagg cgaagaaatg ccctatgggc ttccgcatag acacccgctg ttttgactca 7320
 acggtcactg agaatgacat ccgtgttgag gagtcaatct accaatgttg tgacttggcc 7380
 cccgaagcca gacaggccat aaggtcgcctc tttacatcgg gggcccccctg 7440
 actaattcta aagggcagaa ctgcggctat cgccggtgcc gcgcgagcgg tgtactgacg 7500

55

EP 1 043 399 A2

	accagctgcg	gtaataccct	cacatgttac	ttgaaggccg	ctgcggcctg	tcgagctgcg	7560
	aagctccagg	actgcacgat	gctcgtatgc	ggagacgacc	ttgtcgttat	ctgtgaaagc	7620
5	gcggggaccc	aagaggacga	ggcgagccta	cgggccttca	cggaggctat	gactagatac	7680
	tctgcccccc	ctggggaccc	gccccaaacca	gaatacgact	tggagttgat	aacatcatgc	7740
	tcctccaatg	tgtcagtcgc	gcacgatgca	tctggcaaaa	gggtgtacta	tctcaccctg	7800
	gacccccacca	ccccccctgc	gcgggctgcg	tgggagacag	ctagacacac	tccagtcaat	7860
	tcttggctag	gcaacatcat	catgtatgcg	cccaccttgt	gggcaaggat	gatcctgatg	7920
	actcattttct	tctccatcct	tctagctcag	gaacaacttg	aaaaagccct	agattgtcag	7980
10	atctacgggg	cctgttactc	cattgagcca	cttgacctac	ctcagatcat	tcaacgactc	8040
	catggcctta	gcgcattttc	actccatagt	tactctccag	gtgagatcaa	tagggtggct	8100
	tcatgcctca	ggaaacttgg	ggtaccgccc	ttgcgagtct	ggagacatcg	ggccagaagt	8160
	gtccgcgcta	ggctactgtc	ccaggggggg	agggctgcca	cttgtggcaa	gtacctcttc	8220
	aactgggcag	taaggaccaa	gctcaaaactc	actccaatcc	cggctgcgtc	ccagttggat	8280
	ttatccagct	ggttcgttgc	tgggttacagc	gggggagaca	tatatcacag	cctgtctcgt	8340
15	gccccacccc	gctggttcat	gtggtgccta	ctcctacttt	ctgtaggggt	aggcatctat	8400
	ctactcccca	accgatgaac	ggggagctaa	acactccagg	ccaataggcc	atcctgtttt	8460
	tttccctttt	tttttttctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttctcctttt	8520
	tttttccctt	ttttttcctt	ttctttccctt	tgggtggctcc	atcttagccc	tagtcacggc	8580
	tagctgtgaa	aggtccgtga	gccgcttgac	tgcagagagt	gctgatactg	gcctctctgc	8640
20	agatcaagt						8649

25

30

35

40

45

50

55

<210> 6
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

<400> 6

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgacag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gactacaccg gaattgccag 180
gacgacccgg tcctttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgtc gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaagaaaa aaccaaaccg aacaccaacg ggccgcccac gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaaggagact gctgctattg ggcgagtgcc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgccg 900
ccgaactggt cgccaggctc aagcgccgca tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcgcc gaatgggctg accgcttccct cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc cgagcgatc gccctctatc gccttcttga cgagtcttcc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cgggttccct ctacggggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggtgt cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgtctttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctc ttccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttctctc ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tagagcgagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac tgcacaaagg ggcacaacct cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgccagaag 1680
gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgca accacgggga cgtggttttc cttgaaaaa 1800
cacgataata ccattggccc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctacgctcac aggcggggac aggaaccagg tccgagggga ggtccaagt 1920
gtctccaccg caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcggtg ttggactgtc 1980
tatcatgggt ccggtcctcc gaccttgcc ggcccaagg gcccaatcac ccaatgtac 2040
accaatgtgg accaggacct cgtcggttg caagcgcgcc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct gcggcagctc ggacctttac ttggtcacga ggcatgccga tgtcattccg 2160
gtgcgcggcg ggggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggccgt ctcctacttg 2220
aaggctctt cggtcggtcc actgctctgc cctcgggg atgctgtggg catctttcgg 2280
gctgcggtgt gcaccgaggg ggttcggaag gcggtggact ttgtacccgt cgagtctatg 2340
gaaaccacta tgccgtcccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
acattccagg tggeccatct acacgcccc actggtagcg gcaagagcac taagtgccg 2460
gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgtccgt cgcgccacc 2520
ctaggtttcg gggcgtatat gtctaaggca catggtatcg accctaacat cagaaccggg 2580
gtagggacca tcaccaagg tgccccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttggc 2640
gacggtggtt gctctggggg gcctatgac atcataatat gtgatgagt ccaactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtccctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgteg tgctcgccac cgctacgect ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
atcgagacca tggctctgtc cagcactgga gaaatccct tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc atttctgccc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctatc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaag 3060
acgggcttta ccggcgattt cgactcagt atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gcctggaccc gaccttcacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcg 3180
gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggatgggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctcggtcctg ttcgattcct cggttctgtg cgagtgtcat 3300
gacgcgggct gtgcttggtc cgagctcacg cccgcggaga cctcagttag gttgcgggct 3360
tacctaatac caccagggtc gcccgctgtc caggaccatc tggagttctg ggagagcgct 3420
ttcacaggcc tcaccacat agacgcccac ttctgttccc agactaggca ggcaggagac 3480
aacttcccc acctggttag ataccaggct acgggtgtgc ccagggtcga ggctccacct 3540

```

EP 1 043 399 A2

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

ccatcggtgg accaaatgtg ggagtgtctc atacggctaa agcctacgct gcacggggcca 3600
 acgcccctgc tgtataggct gggagccgtt caaaacgagg ttactaccac acaccccata 3660
 accaaatata tcatggcatg catgtcggct gacctggagg tcgtcacgag cacctgggtg 3720
 ctggtaggcg gagtccctagc agctctggcc gcgtattgcc tgacaacagg cagcgtggtc 3780
 attgtgggca ggatcatctt gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtcctt 3840
 taccgggagt tcgatgagat ggaagagtgc gcctcacacc tcccttacct cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag gcaatcgggt tgctgcaaac agccaccaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtggtggaa tccaagtggc ggaccctcga agccttcttg 4020
 gcgaagcata tgtggaatlt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtccactctg 4080
 cctggcaacc ccgcgatagc atcaactgat gcattcacag cctctatcac cagcccgtctc 4140
 accacccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat ggggtggccgc ccaacttgct 4200
 cctcccagcg ctgcttctgc ttctgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 atagcctctg ggaagggtgt tgtggatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 gcgctcgtgg cctttaaggt catgagcggc gagatgccct ccaccgagga cctggttaac 4380
 ctactccctg ctatcctctc ccctggcgcc ctagtctgct gggctggtgt cgcagcgata 4440
 ctgctgctgg acgtgggccc aggggagggg gctgtgcagt ggatgaaccg gctgatagcg 4500
 ttctgcttcgc ggggtaacca cgtctccccc acgcactatg tgtctgagag cgacgctgca 4560
 cagcgtgtca ctcatctct ctctagtctt accatcactc agctgctgaa gaggcttcac 4620
 cagtggatca acgaggactg tccacgcca tgcctcggct cgtggctaag agatgtttgg 4680
 gattggatat gcacgggtgtt gactgatttc aagacctggc tccagtccaa gctcctggcg 4740
 cgattgcccg gactccctct ctctctcatgt caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gacggcatca tgcaaacac ctgcccctgt ggagcacaga tcaccggaca tgtgaaaaac 4860
 ggttccatga ggatcgtggg gcttaggacc tgtagtaaca cgtggcatgg aacattcccc 4920
 attaacgcgt acaccacggg ccctgcacg ccctccccgg cgccaaatta ttctaggcg 4980
 ctgtggcggg tggctgtgta ggagtacgtg gaggttacgc ggggtggggg tttccactac 5040
 gtgacgggca tgaccactga caacgtaaag tgcccgtgtc aggttcgggc ccccgaaatt 5100
 ttcacagaag tggatggggg gcggttgca acgtacgtc cagcgtgcaa acccctccta 5160
 cgggaggagg tcacattcct ggtcgggctc aatcaatacc tggttgggtc acagctccca 5220
 tgccggcccg aaccggacgt agcagtgtct acttccatgc tcaccgacct ctcccacatt 5280
 acggcgggaga cggctaagcg taggctggcc aggggatctc cccctcctt ggccagctca 5340
 tcagctagcc agctgtctgc gccttccctt aaggcaacat gcactaccog tcatgactcc 5400
 ccggacgctg acctcatcga ggccaacctc ctgtggcggc agggagatgg cggaacatc 5460
 acccgctgg agtcagaaaa taaggtagta attttgact ctttcgagcc gctccaagcg 5520
 gagggagatg agagggaagt atccgttccg gcggagatcc tgccggaggtc caggaaattc 5580
 cctcgagcga tgcccatatg ggcacgcccc gattacaacc ctccactgtt agagtccctg 5640
 aaggaccccg actacgtccc ccagtggta cacgggtgtc cattgccgcc tgccaaggcc 5700
 cctccgatac cactccacg gagggagagg acggttgctc tgtcagaatc taccgtgtct 5760
 tctgccttgg cggagctcgc caaaaagacc ttccgcagct ccgaatcgtc gggcgtcgac 5820
 agcggcacg caacggcctc tctgaccag ccctccgacg acggcgacgc gggatccgac 5880
 gttgagctgt actcctccat gccccccctt gagggggagc cgggggatcc cgtatctcagc 5940
 gacgggtctt ggtctaccgt aagcagggag gctagtggag acgtcgtctg ctgctcgatg 6000
 tcttacacat ggacaggcg cctgatcacg ccattgcgtg cggaggaaac caagctgccc 6060
 gtcaatgcac tgagcaactc tttgtccgt caccacaact tggctctatg tacaacatct 6120
 cgacgcgcaa gcctgcgca gaagaaggtc accttgaca gactgcaggt cctggacgac 6180
 cactaccggg acgtgtcaca ggagatgaag gcgaaggcgt ccacagttaa ggctaaactt 6240
 ctatccgtgg aggaagcctg taagctgacg ccccccacatt cggccagatc taaatttggc 6300
 tatggggcaa aggacgtccg gaacctatcc agcaaggccg ttaaccacat ccgctccgtg 6360
 tggaaaggact tgctggaaga cactgagaca ccaattgaca ccaccatcat ggcaaaaaat 6420
 gaggttttct gcgtccaacc agagaaggga ggccgcaagc cagctcgctt tatcgtatct 6480
 ccagatttgg gggttcgtgt gtgcgagaaa atggcccttt acgatgtggg ctccaccctc 6540
 cctcaggccg tgatgggctc ttcatacgga ttccaatact ctctggaca gcgggtcgag 6600
 ttctgtgtga atgcctggaa agcgaagaaa tgccctatgg gcttcgcata tgacaccgcg 6660
 tgttttgact caacggtcac tgagaatgac atccgtgttg aggagtcaat ctaccaatgt 6720
 tgtgacttgg ccccggaagc cagacaggcc ataaggctcg tcacagagcg gctttacatc 6780
 gggggccccc tgactaatc taaagggcag aactgcggct atcgccgggt ccgcgcgagc 6840
 ggtgtactga cgaccagctg cggtaatacc ctcacatggt atttgaaggc cgctgcggcc 6900
 tgtcgagctg cgaagctcca ggactgcacg atgctcgtat gcggagacga ccttgtcgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagaggac gaggcgagcc tacgggcctt caggagggt 7020
 atgactagat actctgccc ccctggggac ccgcccacac cagaatacga cttggagttg 7080
 ataacatcat gctcctccaa tgtgtcagtc gcgcacgat catctggcaa aagggtgtac 7140
 tatctcacco gtgacccccc cccccccctt gcgcgggctg cgtgggagac agctagacac 7200
 actccagtca attcctgggt aggcaacatc atcatgtatg cgcccacctt gtgggcaagg 7260
 atgatcctga tgactcattt ctctccatc ctcttagctc aggaacaact tgaaaaagcc 7320
 ctgagattgtc agatctacgg ggcctgttac tccattgagc cacttgacct acctcagatc 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgcattt tcactccata gttactctcc aggtgagatc 7440
 aatagggtgg ctteatgcct caggaaactt ggggtaccgc ccttgcgagt ctggagacat 7500

EP 1 043 399 A2

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggctactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttggtgc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggctgcg	7620
5	tcccagttgg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccgacc	ccgctgggtc	atgtggtgcc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcacat	atctactccc	caaccgatga	acggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctggt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttcc	ctttttttcc	ttttctttcc	tttggtggct	ccatcttagc	7920
	cctagtcacg	gctagctgtg	aaaggtccgt	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
10	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 7
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

<400> 7

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgta ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggg gactacaccg gaattgccag 180
gacgacggg tcccttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgttggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgtatttg ggcgagtgcc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgag gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgccg 900
ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatgc 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttgggcgc gaatgggctg accgcttcc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctacgggat caattccgcc cctctccctc cccccccctc 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggtgt cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctc ttcccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgacggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaggc ggcaacaacc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtc aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaaggga tgcccagagg 1680
gtaccccatc gtatgggata tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggccccccga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaaagaa aaaccaaacy taacaccaac 1860
cgccgcccac aggaagtcac gttcccgggc ggtggtcaga tcgtcggtgg agtttacctg 1920
ttgccgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggctg 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggcctgg 2040
gctcagcccc ggtaccctgc gccctctat ggcaatgagg gcttggggtg ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac cccgtggtc tcggcctagt tggggcccca cggaaccccg gcgtaggctg 2160
cgcaatttgg gtaaggctat cgataccctc acgtgcggct tcgccgatct catggggtac 2220
attcgcgtcg tcggcgcccc cctagggggc gctgcacagg ccttgccgca tggcgctcgg 2280
gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgtct cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt cacgaacgac tgctccaacg caagcattgt gtataggcca 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgct gtgccctgcg ttccggagaa caactcctcc 2520
cgctgtctgg tagcgctcac tcccacgctc gcggccagga acgctagcgt ccccaactacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgtcgtt ggggcggctg ctctctgctc cgctatgtac 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttctc gtgcgccagc tgttcacctt ctcgcctcgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggctac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgag 2820
ttactccgga tcccacaagc tgtcgtggat atggtggcgg gggccattg gggagtccta 2880
gcgggccttg cctactatcc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctctttgcgg gcgttgacgg gggaaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttacccggg ctatcccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caaactggg 3120
ttccttgctg cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatgccc agagcgcatg 3180
gccagctgca gccccatcga cgcgttcgct caggggtggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccctattgt tggcactacg caccocggcc gtgcggtatc 3300
gtaccccgcg cgcaggtgtg tggctcagtg tactgcttca ccccaagccc tgtcgtggtg 3360
gggacgacgg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacgcg gccccgcaa ttggctgtac atggatgaat 3480
agcaactggg tcaccaagac gtgcgggggc ccccctgta acatcgggg gatcggaat 3540

```

	aaaaccttga	cctgccccac	ggactgcttc	cggaagcacc	ccgaggccac	ttacaccaag	3600
	tggtggttcg	ggccttggtt	gacacccaga	tgcttggtcc	actaccata	caggctttgg	3660
	cactacccct	gcactgtcaa	ctttaccatc	ttcaagggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
5	gagcacaggg	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	agcgttgtaa	cctggaggac	3780
	agggacagat	cagagcttag	cccgtctgtg	ctgtctacaa	cggagtggca	ggtattgccc	3840
	tgttccttca	ccaccctacc	ggctctgtcc	actggtttga	tccatctcca	tcagaacgtc	3900
	gtggacgtac	aatacctgta	cggtataggg	tcggcggttg	tctcctttgc	aatcaaatgg	3960
	gagtatgtcc	tggttgctct	ccttcttctg	gcggaacgcg	gcgtctgtgc	ctgcttgtgg	4020
	atgatgctgc	tgatagctca	agctgaggcc	gccctagaga	acctggtggt	cctcaacgcg	4080
	gcateccgtg	ccggggcgca	tggtcattct	tccttctctg	tggtcttctg	tgctgcctgg	4140
10	tacatcaagg	gcaggctggt	ccctggggcg	gcataatgcc	tctacggcgt	atggccgcta	4200
	ctcctgctcc	tgctggcggt	accaccacga	gcatacgcca	tggaacggga	gatggcagca	4260
	ctgtgctggg	gcgcgggttt	cgtaggtctg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag	4320
	ctgttccctg	ctaggctcat	atgggtggtta	caatatattta	tcaccagggc	cgaggcacac	4380
	ttgcaagtgt	ggatcccccc	cctcaacggt	cggggggggc	gcgatgccgt	catcctcctc	4440
	acgtgctgca	tcaccccgca	gctaattcttt	accatcacca	aaatcttgct	cgccatactc	4500
15	ggtccactca	tggtgctcca	ggctggtata	accaaagtgc	cgtacttctg	gcgcgcacac	4560
	gggtctcatt	gtgcatgcat	gctggtgctg	aaggttgctg	gggttcatta	tggtccaaatg	4620
	gctctcatga	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgacctct	caccccactg	4680
	cgggactggg	cccacgcggg	cctacagagc	cttgcggtgg	cagttgagcc	cgctgtcttc	4740
	tctgatattg	agaccaaggt	tatcacctgg	ggggcagaca	ccgcggcgtg	tggggacatc	4800
	atctttggcc	tgcccgtctc	cgcccgcagg	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
	agccttgagg	ggcagggtg	gcgactcctc	cgccctatta	cggcctactc	ccaacagacg	4920
20	cgaggcctac	ttggctgcat	catcactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggctcag	4980
	ggggaggtcc	aagtgtctct	caccgcaaca	caatctttcc	tggcgacctg	cgtcaatggc	5040
	gtgtgttgga	ctgtctatca	tggtgcgggc	tcaaagacct	ttgcgggccc	aaaggggcca	5100
	atcacccaaa	tgtacaccaa	tgtggaccag	gacctcgtcg	gctggcaagc	gccccccggg	5160
	gcgcgttcc	tgacaccatg	cacctgcggc	agctcggacc	tttacttgg	cacgaggcat	5220
	gcccgtgcca	ttccggtgcg	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagccctact	ctcccccagg	5280
25	cccgtctcct	acttgaagg	ctcttcgggc	gggtccactgc	tctgcccctc	ggggcatgct	5340
	gtgggcatct	ttcgggctgc	cgtgtgcacc	cgagggttgg	cgaaggcgtg	ggacttttga	5400
	cccgtcgagt	ctatggaaac	cactatgcgg	tccccggtct	tcacggacaa	ctcgtcccct	5460
	ccggccgtac	cgacagcatt	ccagggtggc	catctacacg	cccctactgg	tagcggcaag	5520
	agcactaagg	tgcccgctgc	gtatgcagcc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaaccog	5580
	tccgtcgccg	ccaccctagg	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	tatcgaccct	5640
	aacatcagaa	ccggggtagg	gaccatcacc	acgggtgccc	ccatcacgta	ctccacctat	5700
30	ggcaagtctc	ttgccgacgg	tggttgctct	ggggggcgct	atgacatcat	aatatgtgat	5760
	gagtgcactg	caactgactc	gaccactatc	ctgggcatcg	gcacagtcc	ggaccaagcg	5820
	gagacgctgc	gagcgcgact	cgtctgcttc	gccaccgcta	cgctccggg	atcgggtcac	5880
	gtgccacatc	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccctttat	5940
	ggcaaaagcca	tccccatcgc	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgccattcc	6000
	aagaagaaat	gtgatgagct	cgccgcgaag	ctatccggcc	tcggactcaa	tgctgtagca	6060
35	tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaactagcg	gagacgtcat	tgctgtagca	6120
	acggacgctc	taatgacggg	ctttaccggc	gatttcgact	cagtgtatga	ctgcaatata	6180
	tgtgtcacc	agacagtcca	cttcagcctg	gaccgcacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
	gtgccacaag	acgcggtgtc	acgctcgca	cgccgaggca	ggactggtag	gggcaggatg	6300
	ggcattttaca	ggtttgtgac	tccaggagaa	cgccctccgg	gcatgttcga	ttcctcggtt	6360
	ctgtgctgag	gctatgacgc	gggctgtgct	tggtacgagc	tcacgcccgc	cgagacctca	6420
40	gttaggttgc	gggcttacct	aaacacacca	gggctgccc	tctgccagga	ccatctggag	6480
	ttctggggaga	gggtctttac	aggcctcacc	cacatagacg	cccatttctt	gtcccagact	6540
	aggcaggcag	gagacaactt	cccctacctg	gtagcatacc	aggctacggt	gtgcgccagg	6600
	gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtgggagt	gtctcatacg	gctaaagcct	6660
	acgtgtcacg	ggccaaacgc	cctgtgtgat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
	accacacacc	ccataaccaa	atacatcatg	gcatgcatgt	cggtgacct	ggaggtcgtc	6780
	acgagcacct	gggtgctggt	aggcggagtc	ctagcagctc	tgcccgcgta	ttgcctgaca	6840
45	acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgctcg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacagggaag	tcctttaccg	ggagtctgat	gagatggaag	agtgcgcctc	acacctccct	6960
	tacatcgaa	agggaaatga	gctcgcga	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
	caaacagcca	ccaagcaagc	ggaggctgct	gctcccggtg	tggaatccaa	gtggcggaac	7080
	ctcgaagcct	tctgggcgaa	gcataatgtg	aatttcatca	gcgggataca	atatattgca	7140
	ggctttgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct	7200
	atcacagcag	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
50	gccgcccaac	ttgtctcctc	cagcgtgct	tctgctttcg	taggcgcggg	catcgctgga	7320
	gcggtgtgtg	gcagcatagg	ccttgggaag	gtgctgtgtg	atattttggc	aggttatgga	7380
	gcaggggtgg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggtcatga	gcggcgagat	gcctccacc	7440
	gaggacctgg	ttaacctact	cctgtctatc	ctctcccctg	gcgcctagtg	cgtcggggtc	7500

gtgtgcgag cgatactgag tgggacgtg gggccaggag agggggctgt gcagtggatg 7560
 aaccggctga tagcggttcg ttcgggggt aaccacgtct ccccccacga ctatgtgtct 7620
 gagagcgacg ctgcagcacg tgcactcag atcctctcta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagaggc ttcaccagtg gatcaacgag gactgtctca cggcatgctc cggctcgtgg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatatgcag gtgttgactg atttcaagac ctggctccag 7800
 tccaagctcc tgcgcgatt gccgggagtc ccttctctct catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagtctggc ggggcgacgg catcatgcaa accacctgcc catgtggagc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggttc catgaggatc gtggggccta ggacctgtag taacacgtgg 7980
 catggaacat tccccattaa cgcgtacacc acggggccct gcacgccctc cccggcgcca 8040
 aattattcta gggcgctgtg gcggttggt gctgaggagt acgtggaggt tacgcgggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacaacg taaagtggcc gtgtcagggt 8160
 ccggcccccg aattcttcac agaagtggat tgggtgcggt tgcacaggta cgctccagcg 8220
 tgcaaacccc tcctacggga ggaggtcaca ttctgtgtcg ggctcaatca atacctggtt 8280
 gggtcacagc tcccatgagg gcccgaaacg gacgtagcag tgctcacttc catgtcacc 8340
 gacccctccc acattacggc ggagacggct aagcgtaggc tggccagggg atctccccc 8400
 tccttgggca gctcatcagc tagccagctg tctgcgcctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 accgtcatg actccccga cgtgacctc atcgaggcca acctcctgtg gcggcaggag 8520
 atgggaggga acatcacccg cgtggagtca gaaaataagg tagtaatttt ggactctttc 8580
 gagccgctcc aagcggagga ggatgagagg gaagtatccg ttccggcgga gatcctgcgg 8640
 aggtccagga aattccctcg agcgtgccc atatgggac gcccgatta caacctcca 8700
 ctgttagagt cctggaagga cccgagctac ttccctccag tggtacacgg gtgtcattg 8760
 ccgctgcca agggccctcc gataccacct ccacggaggg agaggacggt tgtcctgtca 8820
 gaatctaccg tgtctctgct cttggcggag ctgcgccaaa agaccttcgg cagctccgaa 8880
 tcgtcgcccg tcgacagcgg cacggcaacg gcctctctcg accagccctc cgacgcagcg 8940
 gacgcgggtg ccgacggtga tctgtactcc tccatgcccc ccttgaggg ggagccggg 9000
 gatcccgatc tcagcgacgg gtcttggtct accgtaagcg aggaggctag tgaggacgtc 9060
 gtctgctgct cgatgtctca cacatggaca ggcgcctga tcacgccatg cgctgcggag 9120
 gaaaccaagc tgcccgtaa tgcactgagc aactctttgc tccgtacca caacttggtc 9180
 tatgtacaa catctcgag cgcaagcctg ctcagaaga aggtcacctt tgacagagc 9240
 caggctctgg acgaccacta cgggacgtg ccgaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gttaaaggta aacttctatc cgtggaggaa gctgtgaagc tgacgcccc acattcgcc 9360
 agatctaaat ttggctatgg ggcaaggac gtccggaaac tatccagcaa ggccgttaac 9420
 cacatccgct ccgtgtggaa ggactgtctg gaagacactg agacaccaat tgacaccac 9480
 atcatggcaa aaaatgaggt tttctgcgtc caaccagaga agggggcgcg caagcagct 9540
 cgcttatcg tattccaga tttgggggtt cgtgtgtgct agaaaatggc cctttacgat 9600
 gtggtctcca cctccctca ggcgtgatg ggtcttctat acggattcca atactctct 9660
 ggacagcggg tcgagttcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaaatggc tatgggctc 9720
 gcatatgaca cccgtgttt tgactcaacg gtccactgaga atgacatccg tgttagggag 9780
 tcaatctacc aatgttgta cttggcccc gaagccagac agggccataag gtcgctcaca 9840
 gagcggtttt acatcggggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 cggtgcccgc cgagcgtgt actgacgacc agctgcggtg ataccctcac atgttatttg 9960
 aaggccgctg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 10020
 gacgaccttg tcgttatctg tgaaagcgcg gggacccaag aggacgaggc gagectacgg 10080
 gccttcacgg aggtatgac tagatactct gcccccctg gggacccgcc caaaccagaa 10140
 tacgacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtcgcgca cgatgcatct 10200
 ggcaaaaggg tgtactatct caccgtgac cccaccacc ccttgcgcg ggetgcgtgg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggttaggca acatcatcat gtatgcgccc 10320
 accttggtgg caaggatgat cctgatgact cattctctct ccatccttct agctcaggaa 10380
 caacttga aaagccctaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgagccactt 10440
 tctccagggt agatcattca agactccat ggccttagcg cattttcact ccatagttag 10500
 cgagtctgga gacatcgggc cagaagtgtc tgcctcagga aacttggggt accgccctt 10560
 gctgccactt gtggcaagta cctctcaac cgcgtaggc tactgtccca gggggggagg 10620
 ccaatcccgg ctgctgccca gttggattta tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
 ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaccccgt tcggtgctgg ttacagcggg 10740
 ctactttctg taggggtagg catctatcta ccccccaacc ggttcatgtg gtgcctactc 10800
 ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt ctccccacc gatgaacggg gagctaaca 10860
 tttttttttt tttttttttt tctttttttt cctttttttt ttttcttttt tttttttttt 10920
 tggtctccatc tttttttttt tctttttttt tctgtgaaag ttttcttttt ttttcttttt 10980
 agagagtgtc gatactggcc tctctgcaga tcaagt tccgtgagcc gcttgactgc 11040
 11076

<210> 8
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

```

<400> 8
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccgt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgacgggg tcctttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gctgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcagc aatccataac 360
ctcaagaaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtct ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
ctgtgctggc cagcaggggc gtctcttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgtatttg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcttgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgtcat acgcttgatc 780
cggctacctg ccatttcgac caccaagcga aacatcgcat cgacgagca cgtaactcga 840
tggaagccgg tcttgcgatc caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcagc 900
ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgtgaaga gcttgccggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccctc 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctc tcccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaaggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgacggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gcacaaccc cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ttcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtacccatt gtatgggac tgatctgggg cctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggtttct cttgaaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctagcctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
gtctccacgg caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
tatctggtg ccggctcaaa gaccttgcg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg accaggacct cgtcggcttg caagcgcccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct gcggcagctc ggacctttac ttggtcagca ggcatgccga tgtcattccg 2160
gtgcgccggc ggggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccgt ctccacttg 2220
aagggtcttt cggcggtcc actgctctgc cctcggggc acgctgtggg catcttctcg 2280
gctgccgtgt gcaccgagg ggttcgaag gcggtggact ttgtaccctg cgagtctatg 2340
gaaaccacta tgccgtcccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgcccc actggtagcg gcaagagcac taagggtccg 2460
gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgtccgt cgcgccacc 2520
ctaggtttcg gggcgatat gtctaaggca catggtatcg accctaact cagaatcggg 2580
gtaaggacca tcaccacggg tgcccccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
gacggtggtt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtccctggacc aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgtcg tgctcgccac cgctacgcct ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatccct tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaag 3060
acgggcttta ccgtgactt cgaactcagtg atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gcctggaccc gaccttcacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcg 3180
gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggatgggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctcgggcctg ttcgattcct cgttctctgt cgagtctat 3300
gacgcgggct gtgcttggtg cgagctcacg cccgcggaga cctcagttag gttgcgggct 3360
tacctaatac caccaggggt gcccgctctg caggaccatc tggagttctg ggagagcgtc 3420
tttacaggcc tcaccacat agacgcccac ttcttgtccc agactaagca ggcaggagac 3480
aacttccctt acctggtagc ataccaggct acggtgtgcy ccagggtcga ggctccacct 3540

```

55

EP 1 043 399 A2

	ccatcggtggg	accaaagtgt	gaagtgtctc	atacggtctaa	agcctacgct	gcacggggcca	3600
	acgcccctgc	tgtataggtc	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata	3660
	accaaaataca	tcatggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcacgag	cacctgggtg	3720
5	ctggttaggcg	gagtcctagc	agctctggcc	gcgtattgcc	tgacaacagg	cagcgtggtc	3780
	attgtgggca	ggatcatctt	gtccggaaag	ccggccatca	ttcccgacag	ggaagtcctt	3840
	taccgggagt	tcgatgagat	ggaagagtgc	gcctcacacc	tcccttacat	cgaacaggga	3900
	atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaag	gcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccaag	3960
	caagcggagg	ctgctgtccc	cgtggtggaa	tccaagtggc	ggaccatcga	agccttctgg	4020
	gcgaagcata	tgtggaattt	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggctt	gtccactctg	4080
	cctggcaacc	ccgcgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgtct	4140
10	accaccaaac	ataccctcct	gtttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaacttgct	4200
	cctcccagcg	ctgcttctgc	tttcgtaggg	gccggcatcg	ctggagcggc	tgttggcagc	4260
	atagggcctt	ggaaggtgct	tgtggatatt	ttggcaggtt	atggagcagg	ggtggcaggc	4320
	gcgctcgtgg	cctttaagggt	catgagcggc	gagatgccct	ccaccgaggga	cctgggttaac	4380
	ctactcctcg	ctatcctctc	ccctggcgcc	ctagtctgtg	gggtcgtgtg	cgcagcgata	4440
	ctgcgtcgcc	acgtgggccc	aggggagggg	gctgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4500
15	ttcgcttcgc	ggggtaacca	cgtctccccc	acgcactatg	tgcttgagag	cgcgctgca	4560
	gcacgtgtca	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggtctcac	4620
	cagtggatca	acgaggactg	ctcccagcca	tgctccggct	cgtggctaag	agatggttgg	4680
	gattggatat	gcacgggtgt	gactgatttc	aagacctggc	tccagtccaa	gctcctgccg	4740
	cgatgtccgg	gagtcctcct	cttctcatgt	caacgtgggt	acaagggagt	ctggcggggc	4800
	gacgggcatc	tgcaaacacc	ctgcccattg	ggggcacaga	tcaccggaca	tgtgaaaaac	4860
	ggtttccatga	ggatcgtggg	gcctaggacc	tgtagtaaca	cgtggcatgg	aacattcccc	4920
20	attaacgcgt	acaccacggg	cccctgcacg	ccctccccgg	cgccaaatta	ttctagggcg	4980
	ctgtggcgga	tggtctgtga	ggagtacgtg	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	5040
	gtgacgggca	tgaccactga	cgcagctaaag	tgcccgtgtc	aggttcgggc	ccccgaattc	5100
	ttcacagaag	tggtatgggt	gcggttgcac	aggtacgctc	cagcgtgcaa	acccctccta	5160
	cgggaggagg	tcacattcct	ggtcgggctc	aatcaatacc	tggttgggtc	acagctccca	5220
	tgcgagcccg	aaccggatgt	agcagtgtct	acttccatgc	tcacgcagcc	ctcccaactt	5280
25	acggcggaga	cggttaagcg	taggctggcc	aggggatctc	ctccccctt	ggccagctca	5340
	tcagctagcc	agctgtctgc	gccttccttg	aaggcaacat	gcactaccgc	tcatgactcc	5400
	ccggagcctg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaacatc	5460
	acccgcgtgg	agtcagaaaa	taaggtagta	atlttggaat	clttcgagcc	gctccaagcg	5520
	gaggaggatg	agaggggaag	atccgttccg	gcggagatcc	tgccggaggtc	caggaaattc	5580
	cctcgagcga	tgcccatatg	ggcacgcccc	gattacaacc	ctccactgtt	agagtccctg	5640
	aaggaccctg	actacgtccc	tcacgtggtg	cacgggtgtc	cattgccgcc	tgccaaggcc	5700
30	cctccgatac	caccttcacg	gaggaagagg	acggttgctc	tgtcagaatc	taccgtgtct	5760
	tctgccttgg	cggagctcgc	cacagagacc	ttcggcagct	ccgaatcgtc	ggccgtcgac	5820
	agcggcagcg	caacggcctc	tcctgaccag	ccctccgacg	acggcgacgc	gggatccgac	5880
	ggtgagctgt	actcctccat	gccccccctt	gagggggagc	cgggggatcc	cgatctcagc	5940
	gacgggtctt	ggtctacgtg	aagcggaggg	gctagttagg	acgtcgtctg	ctgctcgatg	6000
	tcctacacat	ggacagcgcg	cctgatcacg	ccatgcgtcg	cggaggaaac	caagctgccc	6060
35	atcaatgcac	tgagcaactc	tttgcctcgt	caccacaact	tggtctatgc	tacaacatct	6120
	cgacgcgcaa	gcctgcggca	gaagaaggtc	acctttgaca	gactgcaggt	cctggacgac	6180
	cactaccggg	acgtgctcaa	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaccct	6240
	ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctgacg	ccccacatt	cggccagatc	taaatattgg	6300
	tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6360
	tggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat	6420
40	gaggttttct	gcgtccaacc	agagaagggg	ggccgcaagc	cagctcgcct	tatcgtattc	6480
	ccagatttgg	gggttcgtgt	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtggg	ctccaccctc	6540
	cctcaggccg	tgatgggctc	ttcatacgga	ttccaatact	ctcctggaca	gcgggtcgag	6600
	ttcctggtga	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccctatgg	gcttcgcata	tgacaccgct	6660
	tgttttgact	caacggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt	6720
	tgtgacttgg	cccccgaaag	cagacaggcc	ataaggtcgc	tcacagagcg	gctttacatc	6780
	gggggacctcc	tgactaattc	taaagggcag	aactgcggct	atcgccgggt	ccgcgcgagc	6840
45	ggtgtactga	cgaccagctg	cggtaatacc	ctcacatgtt	acttgaaggc	cgtgcccggc	6900
	tgtcgagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgctcgt	6960
	atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gagggcgacc	tacgggcctt	cacggaggct	7020
	atgactagat	actctgcccc	ccctggggac	cgcgccaaac	cagaatacga	cttggagttg	7080
	ataacatcat	gctcctccaa	tgtgtcagtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aaggggtgac	7140
	tatctcaccc	gtgacccccc	caccccctt	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac	7200
	actccagcca	atctctggct	aggcaacatc	atcatgtatg	cgccacctt	gtgggcaagg	7260
50	atgatcctga	tgaactcatt	cttctccatc	cttctagctc	aggaacaact	tgaaaaagcc	7320
	ctagattgtc	agatctacgg	ggcctgttac	tccattgagc	cacttgacct	acctcagatc	7380
	attcaacgac	tccatggcct	tagcgcattt	tcactccata	gttactctcc	aggtgagatc	7440
	aatagggttg	cttcattgct	caggaaactt	ggggtaccgc	ccttcgcagat	ctggagacat	7500

55

EP 1 043 399 A2

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggtactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttgtggc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggctgcg	7620
5	tcccagttgg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccgaac	ccgctgggtc	atgtgggtgc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcatct	atctactccc	caaccgatga	acgggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctgtt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttcc	ctttttttcc	ttttctttcc	tttggtggct	ccatcttagc	7920
	cctagtcacg	gctagctgtg	aaaggctcgt	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
10	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 9
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

<400> 9

10

15

20

25

30

35

40

45

50

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgga ggaactactg 60
tcttcaagca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgctgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggg gactacaccg gaattgccag 180
gacgacgggg tcttttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgtgact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagtc cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcgagtgcc cggggcagga tctcctgtca tctcactttg 720
ctcctgcoga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgag ggggtgtcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcaccg 900
ccgaactggt cgccaggtcc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcgcc gaatgggtcg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctc ttcccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatcacac ctgcaaagcg ggcacaaccc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaaggga tgccagaaag 1680
gtacccattt gtatgggacg tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgagggttaa aaaacgtcta ggccccccga accacgggga cgtgggtttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaaagaa aaaccaaagc taacaccaac 1860
cgccgcccac aggcagctcaa gttcccgggc ggtggtcaga tcgtcggtgg agtttacctg 1920
ttgccgcgca gggggcccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccagagg tagggcctgg 2040
gctcagcccc ggtacccctg gccctctat ggcaatgagg gcttgggggt ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac cccgtggtcc tcggcctagt tggggcccca cggaaccccc gcgtagggtcg 2160
atccgctcg tcggcgcccc cctagggggc acgtgcggct tcgccgatct catggggatc 2220
gttctggagg acggcgtaaa ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgctc cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttctgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt cacgaacgac tgctccaacg caagcattgt gtataggga 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgct gtgccctgag ttccggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgctcac tcccacgtcc gcggccagga acgctagcgt cccactacag 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt gggcgcgctg ctctctgctc cgtatgtac 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttctcc gtcgccagc tgttcacctt ctcgctcgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgag 2820
ttactccgga tcccacaagc tgtcgtggat atggtggcgg gggccatttg gggagtcta 2880
gcgggccttg cctactatcc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctcctttccg gcgttgacgg gggaaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcacccggg tcatcccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caacactggg 3120
ttccttgctg cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatgccc agagcgcatg 3180
gccagctgca gccccatcga cgcgttcgct caggggtggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg caccocggcc gtgcggtatc 3300
gtaccccgcg cgcaggtgtg tggtcagtg tactgcttca cccaagccc tgtcgtgggt 3360
gggacgacgg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacggc gccgcgcaa ttggctgtac atggatgaat 3480
agcactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccgtgta acatcggggg gatcggcaat 3540

```

55

	aaaaccttga	cctgccccac	ggactgcttc	cggaagcacc	ccgaggccac	ttacaccaag	3600
	tgtggttcgg	ggccttggtt	gacacccaga	tgcttggtcc	actaccata	caggctttgg	3660
	cactacccct	gcactgtcaa	ctttaccatc	ttcaagggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
5	gagcacaggc	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	agcgttgtaa	cctggaggac	3780
	agggacagat	cagagcttag	cccgtctgtg	ctgtctacaa	cgaggtggca	ggtattgccc	3840
	tgttccctca	ccaccctacc	ggctctgtcc	actggtttga	tccatctcca	tcagaacgtc	3900
	gtggacgtac	aatacctgta	cggtataggg	tcggcgggtg	tctcctttgc	aatcaaattg	3960
	gagtatgtcc	tggtgtctct	ccttcttctg	gcgagcgcgc	gcgtctgtgc	ctgcttgtgg	4020
	atgatgtctg	tgatagctca	agctgaggcc	gccctagaga	acctggtggt	cctcaacgcg	4080
	gcatccgtgg	ccggggcgca	tggtattctc	tccttctctg	tggtcttctg	tgctgctctg	4140
10	tacatcaagg	gcaggctggt	ccctggggcg	gcataatgcc	tctacgcggt	atggccgcta	4200
	ctcctgtctc	tgctggcggt	accaccacga	gcatacgcga	tggaacggga	gatggcagca	4260
	tcgtgcccgg	gcgcggtttt	cgtaggtctg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag	4320
	ctgttctctg	ctaggctcat	atggtgggtta	caatatattta	tcaccagggc	cgaggcacac	4380
	ttgcaagtgt	ggatcccccc	cctcaacggt	cggggggggc	gcgatgcggt	catcctctct	4440
	acgtgcccga	tcacccacga	acctatcttt	accatcacca	aaatcttctt	cgccatactc	4500
15	gggtccactca	tggtgtctcca	ggctggtata	accaaagtgc	cgtacttctg	gcgcgcacac	4560
	gggtctcattc	gtgcatgcat	gctggtgctg	aaggttgctg	ggggtcatta	tgctccaaatg	4620
	gctctcatga	agtggccgcg	actgacaggt	acgtacggtt	atgacctctc	caccccactg	4680
	cgggactggg	cccacgcggg	cctacgagac	cttgccgttg	cagttgagcc	cgctctcttc	4740
	tctgatatgg	agaccaaggt	tatcacctgg	ggggcagaca	ccgcggcggt	tggggacatc	4800
	atcttgggcc	tgcccgtctc	cgcccgcagg	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
20	agccttgaag	ggcagggggt	gcgactcctc	gcgcctatta	cgccctactc	ccaacagacg	4920
	cgaggcctac	ttggctgcat	catcactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggctcag	4980
	ggggaggtcc	aagtgtgtct	caccgcaaca	caatctttcc	tgccgacctg	cgtcaatggc	5040
	gtgtgttgga	ctgtctatca	tggtgcgggc	tc aaagacct	ttgcccggcc	aaagggccca	5100
	atcacccaaa	tgtacaccaa	tgtggaccag	gacctcgtcg	gctggcaagc	gccccccggg	5160
	gcgcgttctc	tgacaccatg	cacctgcggc	agctcggacc	tttacttggt	cacgaggcat	5220
	gccgatgtga	ttccggtgcg	cgccgggggc	gacagcaggg	ggagccctact	ctcccccagg	5280
25	cccgtctcct	acttgaaggg	ctcttcgggc	ggtccactgc	tctgcccctc	ggggcacgct	5340
	gtggggcatct	ttcgggtctg	cgtgtgcacc	cgagggggtg	cgaaggcggt	ggactttgta	5400
	ccgctcgatc	ctatgaaac	cactatgcgg	tcccgggtct	tcacggacaa	ctcgtccctc	5460
	cgggcccgtac	cgcagacatt	ccagggtggc	catctacacg	cccctactgg	tagcggcaag	5520
	agcactaagg	tgccggctgc	gtatgcagcc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaacccg	5580
	tccgtcgccg	ccaccctagg	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	tatcgacctt	5640
30	aacatcagaa	tcggggtaag	gaccatcacc	acgggtgccc	ccatcacgta	ctccacctat	5700
	ggcaagtcttc	ttgcccagcg	tggttgctct	gggggcgcct	atgacatcat	aatatgtgat	5760
	gagtgcacat	caactgactc	gaccactatc	ctgggcatcg	gcacagtcct	ggaccaagcg	5820
	gagacggctg	gagcgcgact	cgctcgtctc	gccaccgcta	cgctccggg	atcggtcacc	5880
	gtgccacatc	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccttttat	5940
	ggcaaaagcca	tccccatcga	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgccattcc	6000
	aagaagaaat	gtgatgagct	cgccgcgaag	ctgtccggcc	tcggactcaa	tgctgtagca	6060
35	tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaactagcg	gagacgtcat	tgctgtagca	6120
	acggacgctc	taatgacggg	ctttacgggt	gacttcgact	cagtgtatga	ctgcaatata	6180
	tgtgtcacc	agacagtcca	cttcagcctg	gacccgacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
	gtgccacaag	acgcggtgtc	acgctcgag	cgccgaggca	ggactggtag	gggcaggatg	6300
	ggcattttaca	ggtttgtgac	tccaggagaa	cgccctcgg	gcattgttga	ttcctcggtt	6360
	ctgtgcgagt	gctatgacgc	gggtgtgtct	tggtacgagc	tcacgcccg	cgagacctca	6420
40	gttaggttgc	gggcttacct	aaacacacca	gggttgccc	tctgccagga	ccatctggag	6480
	ttctgggaga	gcgtctttac	aggcctcacc	cacatagacg	cccatttctt	gtcccagact	6540
	aagcaggcag	gagacaactt	cccctacctg	gtagcatata	aggctacggt	gtgcgcccag	6600
	gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtggaagt	gtctcatatg	gctaaagcct	6660
	acgctgcacg	ggccaacgcc	cctgtgttat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
	accacacacc	ccataaccaa	atacatcatg	gcattgcatt	cggtgcacct	ggaggtcgtc	6780
	acgagcacct	gggtgtgtgt	aggcggagtc	ctagcagctc	tgcccgcgta	ttgcctgaca	6840
45	acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgctcg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacagggaag	tcctttaccg	ggagtccgat	gagatggaag	agtgcgcctc	acacctccct	6960
	tacatcgaa	agggatgca	gctcggcgaa	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
	caaacagcca	ccaagcaagc	ggaggctgct	gctcccgtgg	tggaattcaa	gtggcggaac	7080
	atcgaagcct	tctggggcga	gcataatgtg	aatttcatca	gcgggataca	atatatttag	7140
	ggcttgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct	7200
50	atcaccagcc	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
	gcccgccaac	ttgctcctcc	cagcgtgctc	tctgctttcg	taggcgcggg	catcgctgga	7320
	gcggctgttg	gcagcatagg	ccttggaag	gtgcttgttg	atattttggc	aggttatgga	7380
	gcaggggtgg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggtcatga	gcggcgagat	gccctccacc	7440
	gaggacctgg	ttaacctact	ccctgctatc	ctctccctcg	gcgccctagt	cgtcggggtc	7500

	gtgtgcgag	cgatactgag	tcggcagctg	ggcccagggg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
	aaccggctga	tagcgttcgc	ttcgcggggt	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgcct	7620
5	gagagcgag	ctgcagcag	tgctactcag	atcctctcta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
	ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgctcca	cgccatgctc	cggtcgtgg	7740
	ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg	gtgttgactg	atttcaagac	ctggctccag	7800
	tccaagctcc	tgccgcgatt	gccgggagtc	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
	ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	accacctgcc	catgtggggc	acagatcacc	7920
	ggacatgtga	aaaacggttc	catgaggatc	gtggggccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7980
10	catggaacat	tccccattaa	cgcgtacacc	acggggccct	gcacgccctc	ccccggcgca	8040
	aattattcta	gggcgctgtg	gcgggtggct	gctgaggagt	acgtggaggt	tacgcgggtg	8100
	ggggatttcc	actacgtgac	gggcatgacc	actgacgacg	taaagtcccc	gtgtcaggtt	8160
	ccggcccccg	aattcttcac	agaagtggat	gggtgctggg	tgacacagga	cgctccagcg	8220
	tgcaaacccc	tcctacggga	ggaggtcaca	ttcctggctg	ggctcaatca	atacctgggt	8280
	gggtcacagc	tcccatgcga	gccgaacccg	gatgtagcag	tgctcacttc	catgtccacc	8340
	gacccctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggc	tggccagggg	atctctccc	8400
15	cccttgggca	gctcatcagc	tagccagctg	tctgcgcctt	ccttgaaggc	aacatgcact	8460
	acccgtcatg	actccccgga	cgtgacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcggcaggag	8520
	atgggaggga	acatcacccg	cgtggagtca	gaaaataagg	tagtaatttt	ggactctttc	8580
	gagccgctcc	aagcggagga	ggtgagaggg	gaagtatccg	ttccggcgga	gatcctgcgg	8640
	agggtccagga	aattccctcg	agcgatgccc	atatgggcac	gcccggatta	caaccctcca	8700
20	ctgttagagt	ccttgaagga	cccggactac	gtccctccag	tgttacaagg	gtgtccattg	8760
	ccgctgcca	aggccccctc	gataccacct	tcacggagga	agaggacggg	tgtcctgtca	8820
	gaatctaccg	tgtcttctgc	cttggcggag	ctcgccacag	agaccttcgg	cagctccgaa	8880
	tcgtcggcgg	tcgacagcgg	cacggcaacg	gcctctctct	accagccctc	cgacgacggc	8940
	gacgcgggat	cgcagcttga	gtcgtactct	tccatgcccc	cccttgaagg	ggagccgggg	9000
	gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttggtct	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9060
	gtctgctgct	cgatgtccta	cacatggaca	ggcgccctga	tcacgccatg	cgctcgggag	9120
25	gaaaccaagc	tgcccatcaa	tgcaactgagc	aactctttgc	tccgtcacca	caacttggtc	9180
	tatgctacaa	cattctcgag	gcgaagcctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacacagtg	9240
	caggctcctg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaaggcgaa	ggcgtccaca	9300
	gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gcctgtgaagc	tgacgcccc	acattcggcc	9360
	agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaggac	gtccggaaac	tatccagcaa	ggccgttaac	9420
30	cacatcgagc	ccagtggaa	ggacttctct	gaagacactg	agacaccaat	tgacacagcc	9480
	atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc	caaccagaga	agggggggcg	caagccagct	9540
	cgcttatctg	tattccagaa	tttgggggtt	cgtgtgtgct	agaaaatggc	cctttacgat	9600
	gtggtctcca	ccctccctca	ggcgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctctc	9660
	ggacagcggg	tcgagtctct	ggtgaatgcc	tggaagcgga	agaaatgccc	tatgggcttc	9720
	gcatatgaca	cccgctgttt	tgactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tgttgaggag	9780
35	tcaatctacc	aatgttgtga	cttggccccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgtccaca	9840
	gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggtcatcgc	9900
	cggtgccgag	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttacttg	9960
	aaggccgctg	cgccctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgtatgcgga	10020
	gacgaccttg	tcgttatctg	tgaaagcgcg	gggacccaag	aggacgaggc	gagcctacgg	10080
	gccttcacgg	aggctatgac	tagatactct	gccccccctg	gggacccgcc	caaaccagaa	10140
40	tacgacttgg	agttgataac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtccgcga	cgatgcatct	10200
	ggcaaaaagg	tgtactatct	caccctgac	cccaccacc	cccttgccgg	ggctgcgtgg	10260
	gagacagcta	gacacactcc	agtcaattcc	tggttaggca	acatcatcat	gtatgcgccc	10320
	accttggtgg	caaggatgat	cctgatgact	catttcttct	ccatccttct	agctcaggaa	10380
	caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10440
	gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	cattttcact	ccatagttac	10500
45	tctccaggty	agatcaatag	ggtggcttca	tgccctcagg	aacttggggg	accgcccttg	10560
	cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgctaggg	tactgtccca	gggggggagg	10620
	gctgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caaactcact	10680
	ccaatccccg	ctgcgtccca	gttggaattta	tccagctggt	tcgttgctgg	ttacagcggg	10740
	ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc	cgaccccgtc	ggttcatgtg	gtgcctacte	10800
	ctactttctg	taggggtagg	catctatcta	ctcccccaac	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
50	ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
	tttttttttt	tttttttttt	tccttttttt	ttcctttttt	tttctttttc	tttctttttg	10980
	tggtctccatc	ttatgcctag	tcacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
	agagagtgtct	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

<210> 10
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5

```

<400> 10
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgta ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
10 gcgagactgc tagccgagta gtgtgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctccta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggccgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cacactgtcc ggtgcctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
15 cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttctc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctctgcgcca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcac acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgacgagcga cgtactcgga 840
tggaagcccg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgccc 900
ccgaactgtt cgcaggctc aagcgcgcca tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
20 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaaccgt atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgtggaaga gcttgccggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcagcgatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccctc 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
25 tccaccatat tgcgtctttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtctc tcccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tagagggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaggcc ggcaaacacc cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcacagaa 1680
gtacccattt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
20 tccaggttaa aaaacgtcta gggccccgga accacgggga cgtggttttc cttgaaaaa 1800
cacgataata ccattggccc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctacgctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagt 1920
gtctccaccg caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
30 tatctgggtg ccggtcmeta gaccttgcc ggccaaaagg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg accaggacct cgtcggttgg caagcgcgcc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct gcggcagctc ggacctttac ttggtcagca ggcatgccga tgtcattccg 2160
35 atggcgcggc ggggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccggt ctccacttg 2220
aagggtctct cggcggttcc actgctctgc cctcggggac acgctgtggg catctttcgg 2280
gctgcccgtg gcacccgagg ggttgcgaag gcggtggact ttgtacccgt cgagtctatg 2340
ggaaccacta tgcggtcccc ggtcttcacg gacaactcgt ccctccggc cgtaccgcag 2400
40 acattccagg tggcccatct acacgcccct actggtagcg gcaagagcac taagggtgcc 2460
gctgctgatg caggccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgctcgt cgcgcgccac 2520
ctaggtttcg gggcgatatg gtctaaggca catggtatcg accctaaccat cagaatcggg 2580
gtaaggacca tcaccacggg tgccccatc acgtactcca cctatggcaa gttcttggc 2640
50 gacggtgggt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagt ccactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtccctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
cgaactcgct tgetcgccac cgctacgect ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccc tttatggcaa agccatcccc 2880
45 atcgagacca tcaagggggg gaggcactc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgtg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggtctta ccggcgactt cgactcagt atcgactgca atacatgtgt caccacagaa 3120
gtcgacttca gcctggaccc gaccttcacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcg 3180
gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggatgggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctcgggcatg ttcgattcct cgttctgtg cgagtctat 3300
50 gacgcgggct gtgcttggtg cgagctcacg ccgcccagaa cctcagttag gttgcccggc 3360
tacctaataa caccaggggt gccgctctgc caggaccatc tggagttctg ggagagcgtc 3420
tttacaggcc tcaccacat agacgcccac ttcttgtccc agactaagca ggacggagac 3480
aacttcccct acctggtagc ataccaggct acgggtgtgc ccagggtcga ggctccacct 3540

```

55

	ccatcgtggg	accaaagtgt	gaagtgtctc	atacggctaa	agcctacgct	gcacggggcca	3600
	acgcccctgc	tgtataggct	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata	3660
	accaaataca	tcatggcatg	catgtcggct	gacctggagg	tcgtcacgag	cacctgggtg	3720
5	ctggtaggcg	gagtcctagc	agctctggcc	gcgtattgcc	tgacaacagg	cagcgtggtc	3780
	attgtgggca	ggatcatctt	gtccggaaaag	ccggccatca	ttcccagacag	ggaagtcctt	3840
	taccgggagt	tcgatygat	ggaagagtgc	gcctcacacc	ttccttacat	cgaacaggga	3900
	atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaag	gcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccaag	3960
	caagcggagg	ctgctgctcc	cgtggtggaa	tccaagtggc	ggaccatcga	agccttcttg	4020
	gcgaagcata	tgtggaattt	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggcct	gtccactctg	4080
	cctgggcaacc	cgcgatagc	atcactgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgtct	4140
10	accacccaac	ataccctcct	gttttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaacttgct	4200
	cctcccagcg	ctgcttctgc	tttctgtaggc	gccggcatcg	ctggagcggc	tgttggcagc	4260
	ataggccttg	ggaaggtgct	tgtggatatt	ttggcagggt	atggagcagg	ggtggcaggc	4320
	gcgctcgtgg	cctttaagggt	catgagcggc	gagttgccct	ccaccgaggga	cctgggttaac	4380
	ctactccctg	ctatcctctc	ccctggcgcc	ctagtcgtcg	gggtcgtgtg	cgacgcgata	4440
	ctcgctcgcg	acgtgggccc	aggggagggg	gctgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg	4500
15	ttcgcttcgc	ggggtaacca	cgtctccccc	acgcactatg	tgccctgagag	cgacgctgca	4560
	gcacgagtc	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggtctcac	4620
	cagtggatca	acgaggactg	ctccacgcca	tgctccggct	cgtggctaag	agatgtttgg	4680
	gattggatat	gcacgggtgt	gactgatttc	aagacctggc	tccagtccaa	gctcctgccg	4740
	cgattgccgg	gagtcctcct	cttctcatgt	caacgtgggt	acaaggagg	ctggcggggc	4800
	gacggcatca	tgcaaacacc	cgcccatgt	ggagcacaga	tcaccggaca	tgtgaaaaac	4860
20	ggttccatga	ggatcgtggg	ctctaggacc	tgtagtaaca	cgtggcatgg	aacattcccc	4920
	attaacgcgt	acaccacggg	cccctgcacg	ccctccccgg	cgccaaatta	ttctaggcg	4980
	ctgtggcggg	taggtgctga	ggagtacgtg	gaggttacgc	gggtggggga	tttccactac	5040
	gtgacgggca	tgaccactga	caacgtaaag	tgcccgtgtc	aggttccggc	ccccgaattc	5100
	ttcacagaag	tgatgggggt	gcggttgcac	aggtacgctc	cagcgtgcaa	accctccta	5160
	cgggaggagg	tcacattcct	ggtcgggctc	aatcaatacc	tggttgggtc	acagctccca	5220
	tcgcagcctg	aaccgcatgt	agcagtgtc	acttccatgc	tcaccgaccc	ctccccatt	5280
25	acggcggaga	cggttaagcg	taggctggcc	aggggatctc	ccccccctt	ggccagctca	5340
	tcagctagcc	agctgtctgc	gccttctctg	aaggcaacat	gcactaccgc	tcatgactcc	5400
	ccggacgctg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaacctc	5460
	acccgcgtgg	agtcagaaaa	taaggtagta	atlttggaact	ctttcgagcc	gctccaagcg	5520
	gaggaggatg	agaggggagt	atccgttccg	gcggagatcc	tgccggaggtc	caggaaattc	5580
	cctcgagcga	tgcccatatg	ggcacgcccc	gattacaacc	ctccactgtt	agagtccctg	5640
	aaggaccctg	actacgtccc	tcagtggta	cacgggtgtc	cattgccgcc	tgccaaggcc	5700
30	cctccgatac	caacttcacg	gaggaagagg	acggttgtcc	tgtcagaatc	taccgtgtct	5760
	tctgccttgg	cggagctcgc	cacagagacc	ttcggcagct	ccgaatcgtc	ggccgtcgac	5820
	agcggcacgg	caacggcctc	tcctgaccag	ccctccgacg	acggcgacgc	gggatccgac	5880
	gttgagtcgt	actcctccat	gccccccctt	gagggggagc	cggggggatcc	cgatctcagc	5940
	gacgggtctt	ggtctaccgt	aagcgaggag	gctagtggag	acgtcgtctg	ctgctcgatg	6000
	tcctacacat	ggacaggcgc	cctgatcacg	ccatgcgctg	cggaggaaac	caagctgccc	6060
35	atcaatgcac	tgagcaactc	tttgcctcgt	caccacaact	tggtctatgc	tacaacatct	6120
	cgacgcgcaa	acctgcggca	gaagaaggtc	acctttgaca	gactgcaggt	cctggacgac	6180
	caactaccgg	acgtgctcaa	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactt	6240
	ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctgacg	ccccacatt	cggccagatc	taaatgttgc	6300
	tatggggcaa	aggacgtccg	gaacctatcc	agcaaggccg	ttaaccacat	ccgctccgtg	6360
	tggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat	6420
40	gagggtttct	gcgtccaacc	agagaagggg	ggcgcgaagc	cagctcgect	tatcgtattc	6480
	ccagatttgg	gggttcgtgt	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtggg	ctccaccctc	6540
	cctcaggccg	tgatgggctc	ttcatacgga	ttccaatact	ctcctggaca	gcgggtcgag	6600
	ttcctggtga	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccctatgg	gcttcgcata	tgacaccgcg	6660
	tggtttgact	caacggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt	6720
	tgtgacttgg	cccccgagc	cagacaggcc	ataaggtcgc	tcacagagcg	gctttacatc	6780
	ggggggcccc	tgactaattc	taaagggcag	aactgcggct	atcgcgggtg	ccgcgcgagc	6840
45	ggtgtactga	cgaccagctg	cggtaatacc	ctcacatgtt	acttgaaggc	cgctgcggcc	6900
	tgtcgagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgtcgtt	6960
	atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gagggcagcc	tacgggcctt	cacggaggct	7020
	atgactagat	actctgcccc	ccctggggac	ccgcccacac	cagaatacga	cttggagtgt	7080
	ataacatcat	gctcctccaa	tgtgtcagtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aagggtgtac	7140
	tatctcacc	gtgacccac	cacccccctt	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac	7200
	actccagtc	attctgggt	aggcaacatc	atcatgtatg	cgccacctt	tggggcaagg	7260
50	atgatcctga	tgactcattt	cttctccatc	cttctagctc	aggaacaact	tgaaaaagcc	7320
	ctagattgtc	agatctacgg	ggcctgttac	tcatttgagc	cacttgacct	acctcagatc	7380
	attcaacgac	tccatggcct	tagcgcattt	tcactccata	gttactctcc	aggtgagatc	7440
	aatagggtgg	cttcatgcct	caggaaacct	gggttacccg	ccttgcgagt	ctggagacat	7500

EP 1 043 399 A2

	cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggctactg	tcccaggggg	ggagggctgc	cacttgtggc	7560
	aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggctgcg	7620
5	tcccagttgg	atztatccag	ctggttcggt	gctggttaca	gcgggggaga	catatatcac	7680
	agcctgtctc	gtgcccgaac	ccgctgggtc	atgtgggtgc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
	gtaggcacat	atctactccc	caaccgatga	acgggggagc	aaacactcca	ggccaatagg	7800
	ccatcctggt	tttttccctt	tttttttttc	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
	ttttctcctt	tttttttcc	ctttttttcc	ttttctttcc	tttggtggct	ccatcttagc	7920
	cctagtcacg	gctagctgtg	aaaggctcgt	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
10	tggcctctct	gcagatcaag	t				8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 043 399 A2

<210> 11
<211> 11076
<212> DNA
<213> Hepatitis C Virus

5

```

<400> 11
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgta ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgctcgtcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggg gactacaccg gaattgccag 180
cagcagccgg tccctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggccgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgcgga gaaagtatcc atcatggetg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacatg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcggg 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgcca 900
ccgaactggt cgccaggtcc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcactg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcgcc gaatgggtcg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc caattcttga cgtgttcttc tgagttaaaa 1200
cagaccacaa cgggttccct ctacgggat caattccgcc ccttccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtgtc ttcccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgcaaggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaagcg ggcacaaccc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtaccccatg gtatgggata tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgagggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac cctcaactaa cctcaaaagaa aaaccaaacy taacaccaac 1860
cgccgcccac aggcagctcaa gttcccgggc ggtggtcaga tcgtcggttg agtttacctg 1920
ttgccgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
caacctcgtg gaagcgacac acctatcccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggcctgg 2040
gctcagcccg ggtaccctcg gccctctat ggcaatgagg gcttggggtg ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac ccggtggtc tcggcctagt tggggcccca cggaaccccg gcgtaggtcg 2160
cgcaatttgg gtaaggcat cgataccctc acgtgcggct tcgcccagat catggggatg 2220
attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg cctggcgca tggcgctcgg 2280
gttctggagg acggcggtga ctagcaaca gggaatctgc ccggttgctc cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgtgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt cagcaacgac tgctccaacg caagcattgt gtataggga 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgac gtgccctgcg ttcgggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgctcac tcccacgctc gcggccagga acgctagcgt cccactacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctggtt ggggcggctg ctctctgctc cgctatgtac 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttcttc gtcgcccagc tgttcacctt ctcgctcgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccgcccagct gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgag 2820
ttactccgga tcccacaagc tgtcgtggat atggtggcgg gggccatttg gggagtcta 2880
gcgggccttg cctactatcc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctcttttggc gcgttgacgg gggaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcacccggg tcatcccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caaactggg 3120
ttccttgctg cgtgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatgccc agagcgcatg 3180
gccagctgca gccccatcga cgcgttcgct cagggtgggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg caccocggcc gtgcggtatc 3300
gtaccccgcg cgcaggtgtg tggctccagt tactgcttca ccccaagccc tgtcgtgggt 3360
gggacgacgg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacggc gccgcgcaa ggcactgggt ttggctgtac atggatgaat 3480
agcactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccgtgta acatcggggg gatcggaat 3540

```

55

EP 1 043 399 A2

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

aaaaccttga cctgccccac ggactgcttc cggaagcacc ccgaggccac ttacaccaag 3600
 tgtggttcgg ggccttgggt gacacccaga tgcttgggtc actaccata caggctttgg 3660
 cactacccct gcaactgtcaa ctttaccatc ttcaagggtta ggaatgacgt ggggggagtg 3720
 gagcacaggc tcgaagccgc atgcaattgg actcgaggag agcgttgtaa cctggaggac 3780
 agggacagat cagagcttag cccgctgctg ctgtctacaa cggagtgga ggtattgccc 3840
 tgttccttca ccaccctacc ggctctgtcc actggtttga tccatctcca tcagaacgtc 3900
 gtggacgtac aatacctgta cggtataggg tcggcgggtg tctcctttgc aatcaaatgg 3960
 gagtatgtcc tgttgctctt ccttcttctg gcggacgcgc gcgtctgtgc ctgcttgtgg 4020
 atgatgtctc tgatagctca agctgaggcc gccctagaga acctgggtgg cctcaacgcg 4080
 gcatccgtgg ccggggcgca tggcattctc tcttctctcg tgttctctg tgctgcctgg 4140
 tacatcaagg gcaggctggg ccctggggcg gcatatgcc tctacggcgt atggccgcta 4200
 ctctgtctcc tgcctggcgt accaccacga gcatacgcca tggaccggga gatggcagca 4260
 tctgtcggga gcgcggtttt ctgaggtctg atactcttga ccttgtcacc gactataag 4320
 ctgttctctc ctaggctcat atggtgggtta caatatttta tcaccagggc cgaggcacac 4380
 ttgcaagtgt ggatccccc cctcaacgtt cggggggggc gcgatgccgt catcctctc 4440
 acgtgcgcga tccaccacga gctaactctt accatcacca aaatcttct cgcatactc 4500
 ggtccactca tgggtgtcca ggctggtata accaaagtgc cgtacttctg gcgcgcacac 4560
 gggctcattc gtgcatgcat gctggtgcgg aaggttgctg ggggtcatta tgtccaaatg 4620
 gctctcatga agttggccgc actgacgtt acgtacgtt atgacctct caccacctg 4680
 cgggactggg cccacgcggg cctacgagac cttgcggtgg cagttgagcc cgtcgtcttc 4740
 tctgatattg agaccaaggt tatcactctg ggggcagaca ccgcgcgtg tggggacatc 4800
 atcttggggc tgcccgctct cgcgcgcagg gggagggaga tacatctggg accggcagac 4860
 agccttgaag gcgcgggtg gcgactctc gcgcctatta cgcctactc ccaacagacg 4920
 cgaggctcac ttggctgcat catcactagc ctcacaggcc gggacaggaa ccaggtcgag 4980
 ggggaggtcc aagtgtctc caccgcaaca caatcttctc tggcgacctg cgtcaatggc 5040
 gtgtgttgga ctgtctatca tgggtccggc tcaaaagacc ttgccggccc aaaggggcca 5100
 atcacccaaa tgtacaccaa tgtggaccag gacctcgtcg gctggcaagc gcccccggg 5160
 gcgcgttctc tgacaccatg cacttgcggc agctcggacc tttacttggg cagcaggcat 5220
 gccgatgtca ttccggtgcg ccgcgggggc gacagcaggg ggaacctact ctccccagg 5280
 cccgtctctc acttgaaggg ctcttcgggc ggtccactgc tctgcccctc ggggcacgct 5340
 gtgggcatct ctcggtctgc cgtgtgcacc cgagggggtg cgaaggcgtg ggaactttga 5400
 ccgctcgagt ttatgggaac cactatgcgg tcccggctc tcaaggacaa ctgctccctc 5460
 ccggccgtac cgcagacatt ccaggtggcc catctacacg cccctactgg tagcggcaag 5520
 agcactaagg tgccggctgc gtatgcaggc caagggtata aggtgcttgt cctgaacccg 5580
 tccgtcgccg ccacctaggt tttcggggcg tatatgtcta aggcacatgg tatcgacct 5640
 aacatcagaa tcggggttaag gaccatcacc acgggtgccc ccatacagta ctccacctat 5700
 ggcaagtctc ttgccgacgg tgggtgctct gggggcgccct atgacatcat aatatgtgat 5760
 gagtgccact caactgactc gacctatctc ctgggcatcg gcacagtcct ggaccaagcg 5820
 gagcggctgc gtcgcgact cgtcgtgctc gccaccgcta cgctctcggg atcggctacc 5880
 gtgccacatc caaacatcga ggaggtggct ctgtccagca ctggagaaat ccccttttat 5940
 ggcaaaagcca tccccatcga gaccatcaag ggggggaggc acctcatttt ctgccattcc 6000
 aagaagaaat gtgatgagct cgccgcgaag ctgtccggcc tggactcaa tgtgtagca 6060
 tattaccggg gccttgatgt atccgtcata ccaactagcg gagacgtcat tgtcgtagca 6120
 acggacgctc taatgacggg ctttaccggc gacttcgact cagtgtatga ctgcaatata 6180
 tgtgtcaccg agacagtoga cttcagcctg gaccggacct tcaccattga gacgacgacc 6240
 gtgccacaag acgcgggtgc acgctcgca cggcgaggca ggaactgtag gggcaggatg 6300
 ggcatttaca ggtttgtgac tccaggagaa cgccctcgg gcattgttga ttctcgggt 6360
 ctgtgcgagt gctatgacgc gggctgtgct tggtagagc tcacgcccgc cgagacctca 6420
 gttaggttgc gggcttacct aaacacacca ggggtgccc tctgccagga ccatctggag 6480
 ttctgggaga gcgtctttac aggcctcacc cacatagacg cccatttctt gtcccagact 6540
 aagcaggcag gagacaactt cccctacctg gtagcatacc aggttacggt gtgcgccagg 6600
 gctcaggctc cactccatc gtgggaccaa atgtggaagt gtctcatacg gctaaagcct 6660
 acgctgcacg ggccaacgc cctgtgtgat aggtggggag ccgttcaaaa cgaggttact 6720
 accacacacc ccataaccaa atacatcatg gcatgcatgt cggctgacct ggaggctgct 6780
 acgagcacct ggggtgctgg aggcggagtc ctgacagctc tggcccgcta ttgcctgaca 6840
 acaggcagcg tggctattgt gggcaggatc atcttgtccg gaaagccggc catcattccc 6900
 gacagggaag tctttaccg ggagttcgat gagatggaag agtgccctc acacctccct 6960
 tacatcgaa cagggaatga gctgcgcgaa caattcaaac agaaggcaat cgggttctctg 7020
 caaacagcca ccaagcaagc ggaggtgctt gctcccgtyg tggaaatcaa gtggcggaac 7080
 atcgaagcct tctgggcgaa gcatatgtgg aatttcatca gcgggataca atatttagca 7140
 ggcttgtcca ctctgcctg caaccccgcg atagcatcac tgatggcatt cacagcctct 7200
 atcaccagcc cgtcaccac ccaacatacc cctctgttta acatcctggg gggatgggtg 7260
 gccgcccaac ttgctcctcc cagcgtgctc tctgtcttcc taggcgcggg catcgctgga 7320
 gcggctgttg gcagcatagg ccttgggaag gtgcttgtgg atattttggc aggttatgga 7380
 gcaggggttg caggcgcgct cgtggccttt aaggtcatga gcggcgagtt gccctccacc 7440
 gaggacctgg ttaacctact cctgtctatc ctctcccctg gcgccctagt cgtcggggtc 7500

EP 1 043 399 A2

	gtgtgcgcag	cgatactgcg	tccggcacgtg	ggcccagggg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
	aaccggctga	tagcgttcgc	ttcgcggggg	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgcct	7620
	gagagcgacg	ctgcagcacg	agtcactcag	atcctctcta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
5	ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgctcca	cgccatgctc	cggtcgtgg	7740
	ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg	gtgttgactg	atttcaagac	ctggctccag	7800
	tccaagctcc	tgccgcgatt	gccgggagtc	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
	ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	accacctgcc	catgtggagc	acagatcacc	7920
	ggacatgtga	aaaacggttc	catgaggatc	gtggggccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7980
	catggaacat	tccccattaa	cgcgtacacc	acggggccct	gcacgccctc	cccggcgcca	8040
10	aattattcta	ggggcgctgtg	gcgggtaggt	gctgaggagt	acgtggaggt	tacgcgggtg	8100
	ggggatttcc	actacgtgac	gggcatgacc	actgacaacg	taaagtgtcc	gtgtcagggt	8160
	ccggcccccg	aattcttcac	agaagtggat	gggggtgcgt	tgacacaggt	cgctccagcg	8220
	tgcaaacccc	tcctacggga	ggaggtcaca	ttcctggctg	ggctcaatca	atacctggtt	8280
	gggtcacagc	tcccatgcga	gcctgaacgg	gatgtagcag	tgctcacttc	catgtctacc	8340
	gacccctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggc	tggccagggg	atctcccccc	8400
15	cccttggcca	gctcatcagc	tcctgcgctg	cttgcgcctt	ccttgaaggc	aacatgcgtg	8460
	acccgtcatg	actccccgga	cgtcgacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcggcaggag	8520
	atggggcgga	acatcacccg	cgtggagtca	gaaaataaag	tagtaatttt	ggactctttc	8580
	gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg	ggagtatccg	ttccggcgga	gatcctgcgg	8640
	aggtccagga	aattccctcg	agcgatgcc	atatgggcac	gcccgatta	caaccctcca	8700
	ctgttagagt	cctggaagga	cccgactac	gtccctccag	tggtacacgg	gtgtccattg	8760
20	ccgcttgcca	aggccccctc	gataccacct	tcacggagga	agaggacggt	tgtcctgtca	8820
	gaatctaccg	tgtcttctgc	cttggcggag	ctcgccacag	agaccttcgg	cagctccgaa	8880
	tcgtcggccg	tcgacagcgg	cacggcaacg	gcctctcctg	accagccctc	cgacgcaggg	8940
	gacgcgcgct	cgcagcttga	tcctgactcc	tcctatgccc	cccttgaggg	ggagccgggg	9000
	gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttggctc	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9060
	gtctgctgct	cgatgtccta	cacatggaca	ggcgccctga	tcacgccatg	cgctcgggag	9120
25	gaaaccaagc	tgcccatcaa	tgactgagc	aactctttgc	tcctgcacca	caacttggtc	9180
	tatgctacaa	catctcgag	cgcgaacctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacacagct	9240
	caggctcctg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaaggcgaa	ggcgtccaca	9300
	gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gcctgtaagc	tgacgcccc	acattcggcc	9360
	agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaggac	gtccgggaac	tatccagcaa	ggcgttaac	9420
	cacatccgct	ccgtgtggaa	ggactgctg	gaagacactg	agacaccaat	tgacaccaac	9480
30	atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc	caaccagaga	aggggggccc	caagccagct	9540
	cgcttatctg	tattcccaga	tttgggggtt	cgtgtgtgctg	agaaaatggc	cctttacgat	9600
	gtggtctcca	ccctccctca	ggcgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctcct	9660
	ggacatcggg	tcgagttcct	ggtgaatgcc	tggaagcga	agaaatgcc	tatgggtctc	9720
	gcatatgaca	cccgtgttt	tgactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tggtgaggag	9780
	tcaatctacc	aatgttgtga	cttggcccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgctcaca	9840
35	gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggtatctgc	9900
	cggtgcgcg	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttacttg	9960
	aaggccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgtatgcgga	10020
	gacgaccttg	tcgttatctg	tgaaagcgcg	gggacccaag	aggacgaggc	gagcctacgg	10080
	gccttcacgg	aggctatgac	tagatactct	gccccccctg	gggacccgcc	caaaccagaa	10140
	tacgacttgg	agttgataac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtgcgcga	cgatgcatct	10200
40	ggcaaaaagg	tgtaactatc	cacccgtgac	cccaaccacc	cccttgcccg	ggctgcgtgg	10260
	gagacagcta	gacacactcc	agtcaattcc	tggttaggca	acatcatcat	gtatgcgccc	10320
	accttgtggg	caaggatgat	cctgatgact	catttcttct	ccatccttct	agctcaggaa	10380
	caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10440
	gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	catttttact	ccatagttac	10500
	tctccagggtg	agatcaatag	ggtggcttca	tgccctcagga	aacttggggt	accgcccttg	10560
45	cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgctaggc	tactgtccca	gggggggagg	10620
	gctgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caaactcaact	10680
	ccaatcccg	ctgcgtccca	gttgatttca	tcagctgggt	tcgttgctgg	ttacacgggg	10740
	ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc	cgaccccgct	ggttcatgtg	gtgcctactc	10800
	ctactttctg	taggggtagg	catctatcta	ctcccccaac	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
	ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
50	tttttttttt	tttttttttc	tctttttttt	ttctcttttt	tttctttttc	tttcttttgg	10980
	tggtctccatc	ttttccctag	ctacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
	agagagtgtc	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

55

Patentansprüche

1. Hepatitis C Virus (HCV) Zellkultursystem, das im wesentlichen eukaryontische Zellen umfaßt, die eingeschleustes HCV-spezifisches Genmaterial enthalten, dadurch gekennzeichnet,

daß die eukaryontischen Zellen humane Hepatomazellen sind und daß das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt ist, das die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt.

2. Zellkultursystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß die Hepatomazellen von einer handelsüblichen Hepatomazelllinie abstammen.

3. Zellkultursystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß die Hepatomazellen aus einer Hepatoprimärzellkultur gewonnen sind.

4. HCV-RNA-Konstrukt, dadurch gekennzeichnet,

daß es die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt.

5. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,

daß es eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Sequenzprotokolle SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 11 umfaßt.

6. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,

daß die 3' NTR eine Nukleotidsequenz aufweist, die aus der Gruppe der nachfolgend aufgelisteten Nukleotidsequenzen (a) bis (i) ausgewählt ist:

(a) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTTT
TTAGCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTGAGAGAGAGAGTCTCACTCTG
TTGCCCAGACTGGAGT

- 5 (b) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT
CTCACTCTGT TGCCCAGACT GGAGC
- 10 (c) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTAATCTTT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT
CTCACTCTGT TGCCCAGACT GCAGC
- 15 (d) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGAGAGAGAG
AGTCTCACTC TGTTGCCCAG ACTGGAGT
- 20 (e) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGAGAGAGAG
AGTCTCACTC TGTTGCCCAG ACTGGAGT
- 25 (f) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGAGAGAGA
GAGTCTCACT CTGTTGCCCA GACTGGAGT
- 30 (g) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT GAGAGAGAGA
GTCTCACTCT GTTGCCCAGA CTGGAGT
- 35 (h) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTTTAAT CTTTTTTTTT TTTTCCTTT TTTTGAGAGA
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T
- 40 (i) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTTAATC TTTTTTTTTT TTTCTTTT TTTTGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

- 45 7. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
daß das selektierbare Markergen ein Resistenzgen und insbesondere eine Antibiotikaresistenzgen ist.
- 50 8. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
daß das selektierbare Markergen ein Neomycinphosphotransferasegen ist.
- 55 9. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
daß das selektierbare Markergen strangabwärts der 5' NTR in die HCV-RNA integriert ist.
10. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet,

daß das selektierbare Markergen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA verbunden ist.

11. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet,

daß es ein integriertes Reportergen aufweist.

12. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,

daß das Reportergen ein Gen aus der Gruppe der Luziferasegene, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasegen), der GFP-Gene (green-fluorescence-protein-Gene), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) und dem SEAP-Gen (Sezernierte-Alkalische-Phosphatase-Gen) ist.

13. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 11, dadurch gekennzeichnet,

daß deren Replikation die Expression eines (zellulären) Surrogatmarkergens beeinflußt.

14. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet,

daß das Resistenzgen derart in das offene Leseraster der HCV-RNA inkloniert ist, daß es erst nach einer proteolytischen Prozessierung in eine aktive Form überführbar ist.

15. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet,

daß das Reportergen und das selektierbare Markergen derart räumlich in dem Konstrukt angeordnet sind, daß sie gemeinsam ein Fusionsprotein exprimieren.

16. Zellkultursystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet,

daß das HCV-RNA-Konstrukt ein Konstrukt gemäß wenigstens einem der Ansprüche 4 bis 15 ist.

17. Zellkultursystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß die das HCV-RNA-Konstrukt enthaltenden Zellen bei der DSMZ, Braunschweig, BRD, unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC2394 (Laborbezeichnung HuBI 9-13) hinterlegt sind.

18. Verwendung eines Zellkultursystems nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 16 bis 17 und/oder eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 4 bis 15 zur Herstellung und/oder Evaluierung und/oder Testung von Therapeutika und/oder Diagnostika zur Behandlung von insbesondere HCV-Infektionen.

19. Verwendung eines Zellkultursystems nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 16 bis 17 und/oder eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 4 bis 15 zur Herstellung eines Impfstoffes gegen HCV-Infektionen.

20. Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 4 bis 15 zur Herstellung einer leberzellspezifischen Genfähe für die Genterapie .

21. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 15, dadurch gekennzeichnet,

daß es ein integriertes Fremdgen aufweist und dazu geeignet ist, dieses Fremdgen in eine Zielzelle einzuschleusen, die zur Expression dieses Fremdgens geeignet ist.

22. Verfahren zur Gewinnung von zellkultur-adaptierten Mutanten eines HCV-RNA-Konstrukts gemäß einem der Ansprüche 4 bis 15, wobei die Mutanten gegenüber dem HCV-RNA-Konstrukt eine erhöhte Replikationseffizienz aufweisen, dadurch gekennzeichnet,

daß man ein Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen nach einem der Ansprüche 4 bis 15 ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man

aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte oder Teile davon isoliert.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet,

daß man die isolierten HCV-RNA-Konstrukte wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen eines Zellkultursystems nach Anspruch 1 einschleust, das dabei erhaltene Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial das isolierte HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, die gewachsenen Zellklone erntet und aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte isoliert.

24. Verfahren zur Herstellung von Mutanten eines HCV-Vollängengenoms oder eines HCV-Teilgenoms oder eines beliebigen HCV- Konstrukts mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom oder -Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffizienz, dadurch gekennzeichnet,

daß man mit einem Verfahren nach Anspruch 22 oder 23 eine zellkultur-adaptierte Mutante eines HCV-RNA-Konstrukts herstellt und isoliert,
daß man die Nukleotid- und Aminosäuresequenz dieser Mutante bestimmt und durch Vergleich mit der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukts die Art, Anzahl und Positionen der Nukleotid- und Aminosäuremutationen bestimmt,
und daß man diese Mutationen entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten, in ein (isoliertes) HCV- Vollängengenom oder ein HCV-Teilgenom oder ein beliebiges HCV-RNA-Konstrukt einführt.

25. Zellkultur-adaptiertes HCV-RNA-Konstrukt mit hoher Replikationseffizienz, dadurch gekennzeichnet,

daß es durch Nukleotid- und/oder Aminosäure -Mutationen von einem HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 15 ableitbar ist und daß es mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24 erhältlich ist.

26. Zellkultur-adaptiertes HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet,

daß es einen oder mehrere der nachfolgend aufgeführten Aminosäureaustausche aufweist, nämlich 1283 arg -> gly und/oder 1383 glu -> ala und/oder 1577 lys -> arg und/oder 1609 lys -> glu und/oder 1936 pro -> ser und/oder 2163 glu -> gly und/oder 2330 lys -> glu und/oder 2442 ile -> val aufweist.

27. Zellkultur-adaptiertes HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet,

daß es einen oder mehrere der in Tabelle 3 aufgeführten Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche aufweist, wobei Tabelle 3 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

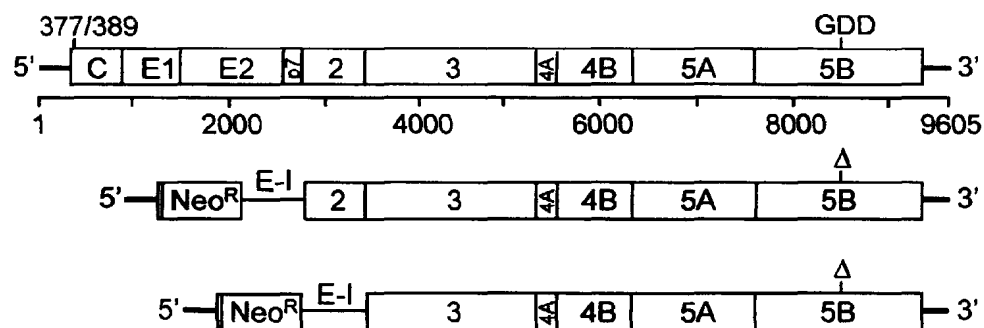
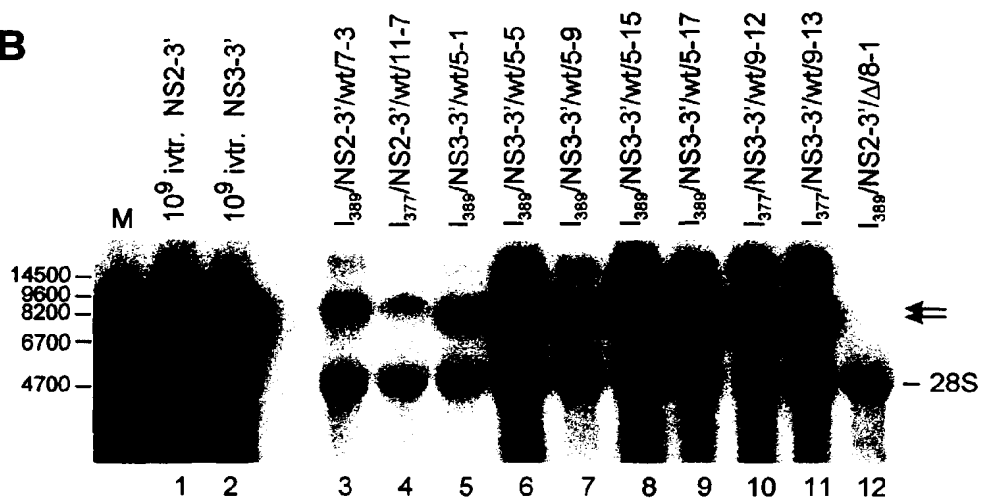
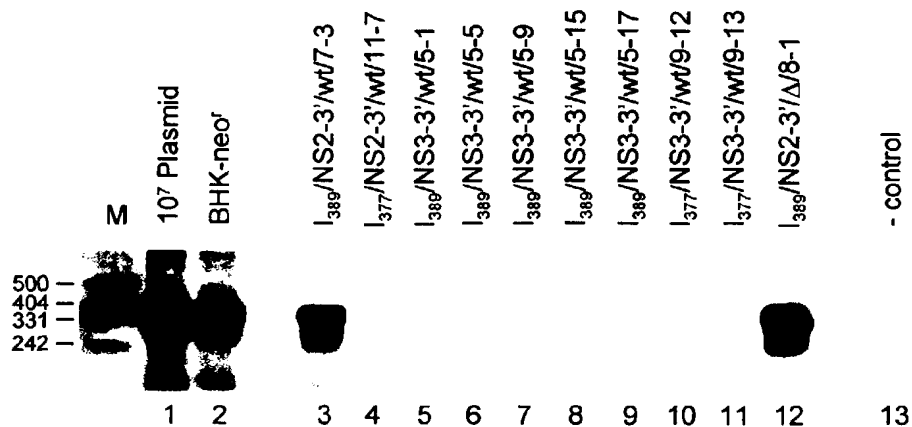
28. Zellkultur-adaptierte Mutanten eines HCV-RNA-Konstrukts oder eines HCV-Vollängengenoms mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukt oder dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom erhöhter Replikationseffizienz, dadurch gekennzeichnet,

daß sie mit einem Verfahren erhältlich ist, bei dem man in einem zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 24 durch Sequenzanalyse und Sequenzvergleich die Art und Anzahl der Mutationen bestimmt und diese Mutationen in ein HCV-RNA-Konstrukt, insbesondere in ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 4 bis 15, oder in ein (isoliertes) HCV-RNA-Vollängengenom einführt, entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten.

29. Hepatitis C Viruspartikel oder virus-ähnliche Partikel dadurch gekennzeichnet,

daß sie mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 22-24 erhältlich sind.

30. Zellen, infiziert mit Hepatitis C Viruspartikeln oder virus-ähnliche Partikeln gemäß Anspruch 29.

A**B****C****Fig. 1**

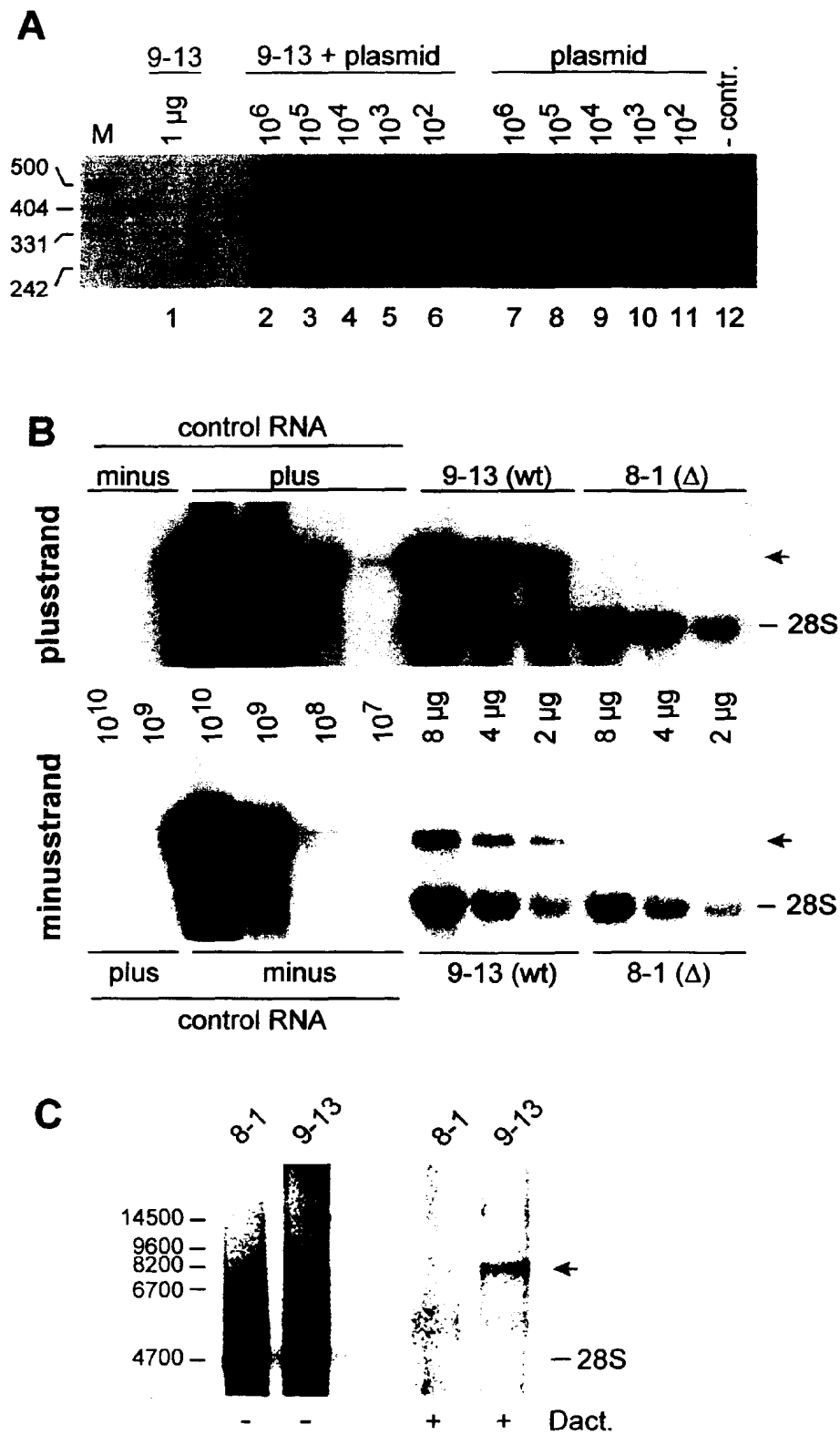


Fig. 2

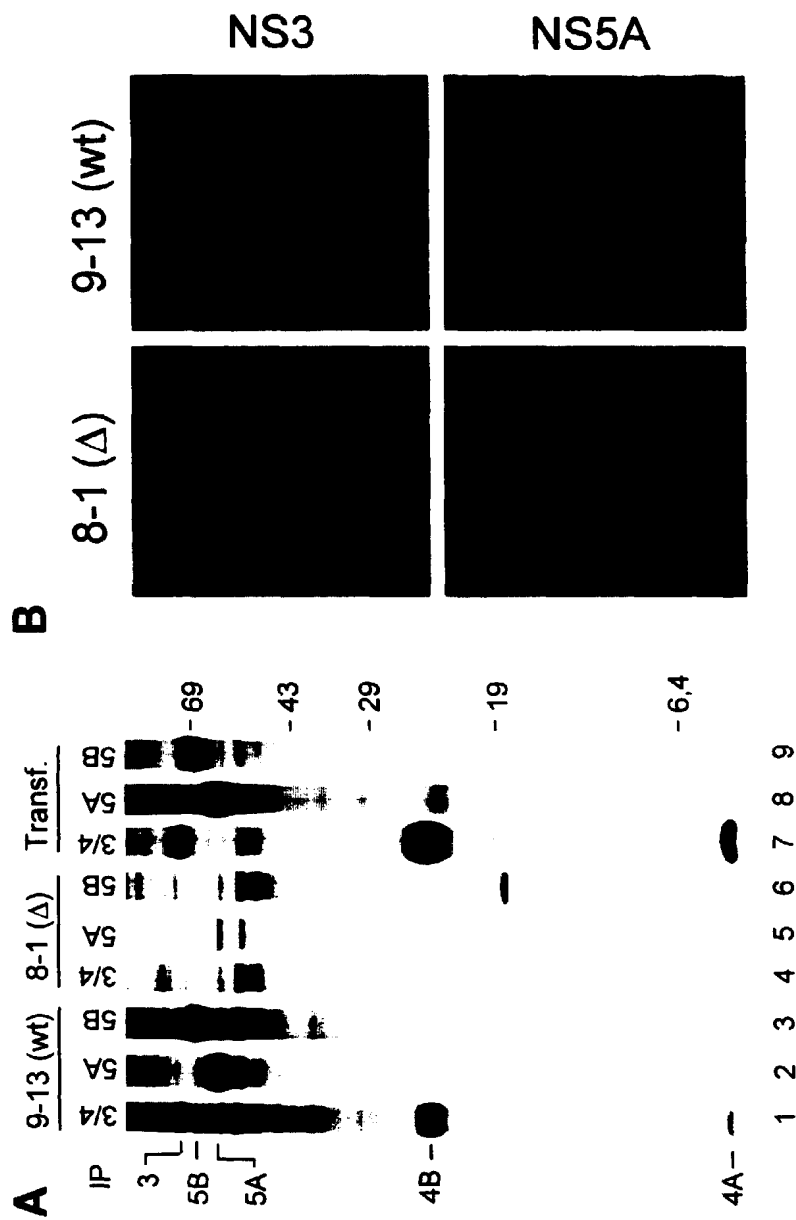


Fig. 3

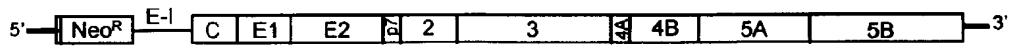
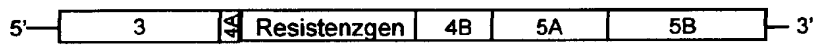


Fig. 4

A



B

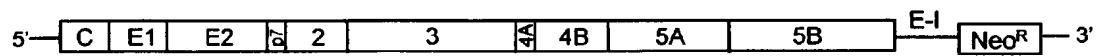
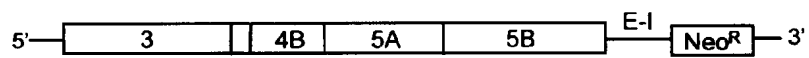


Fig. 5

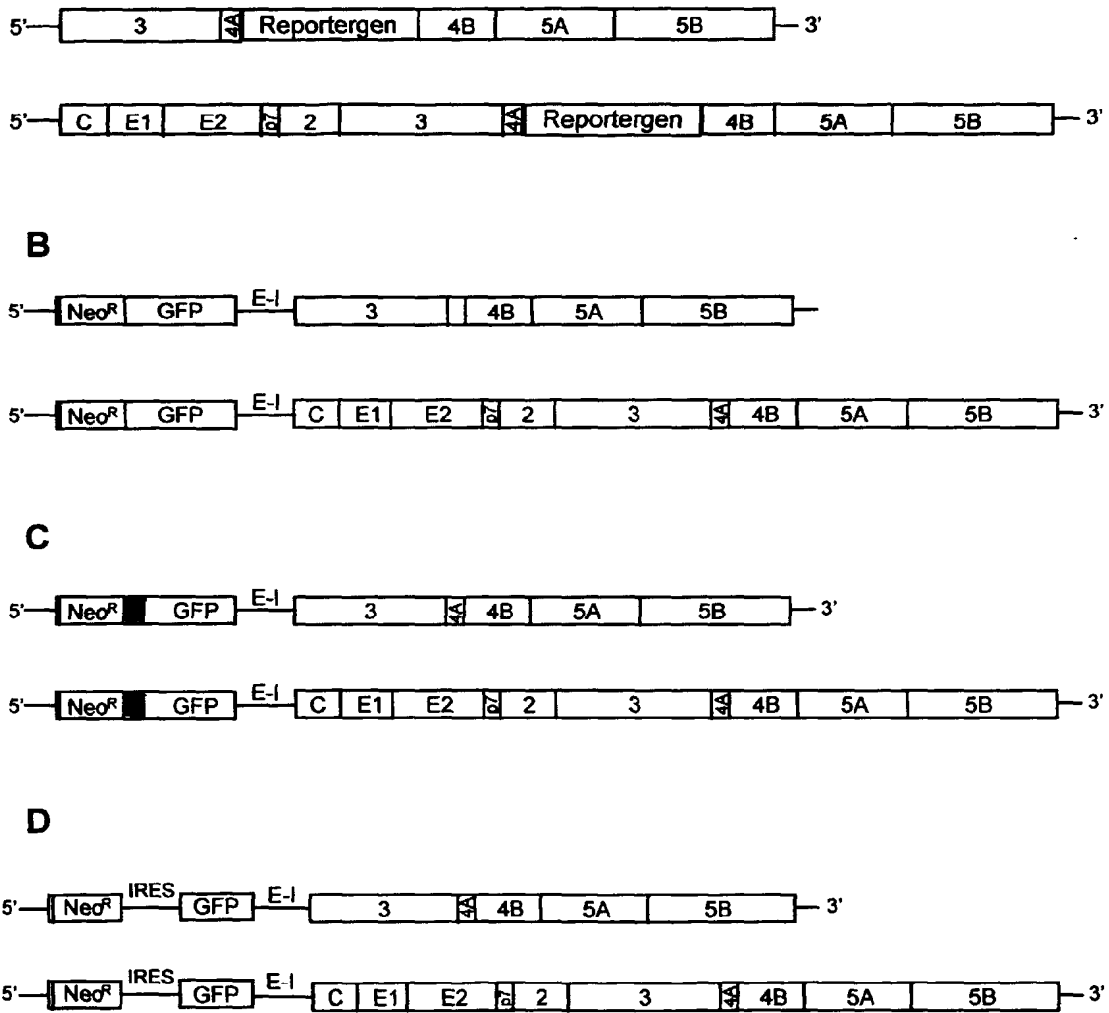


Fig. 6

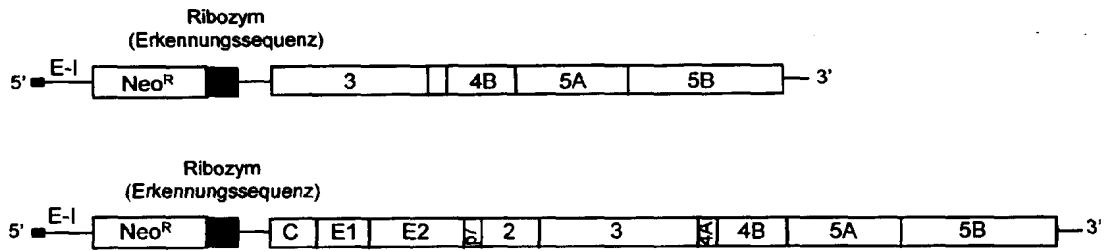


Fig. 7

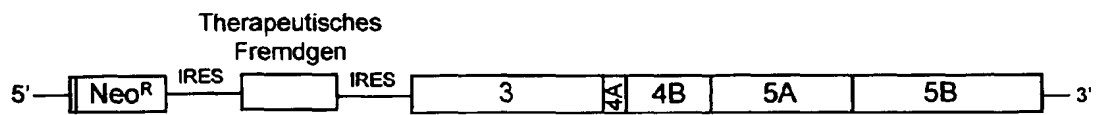


Fig. 8

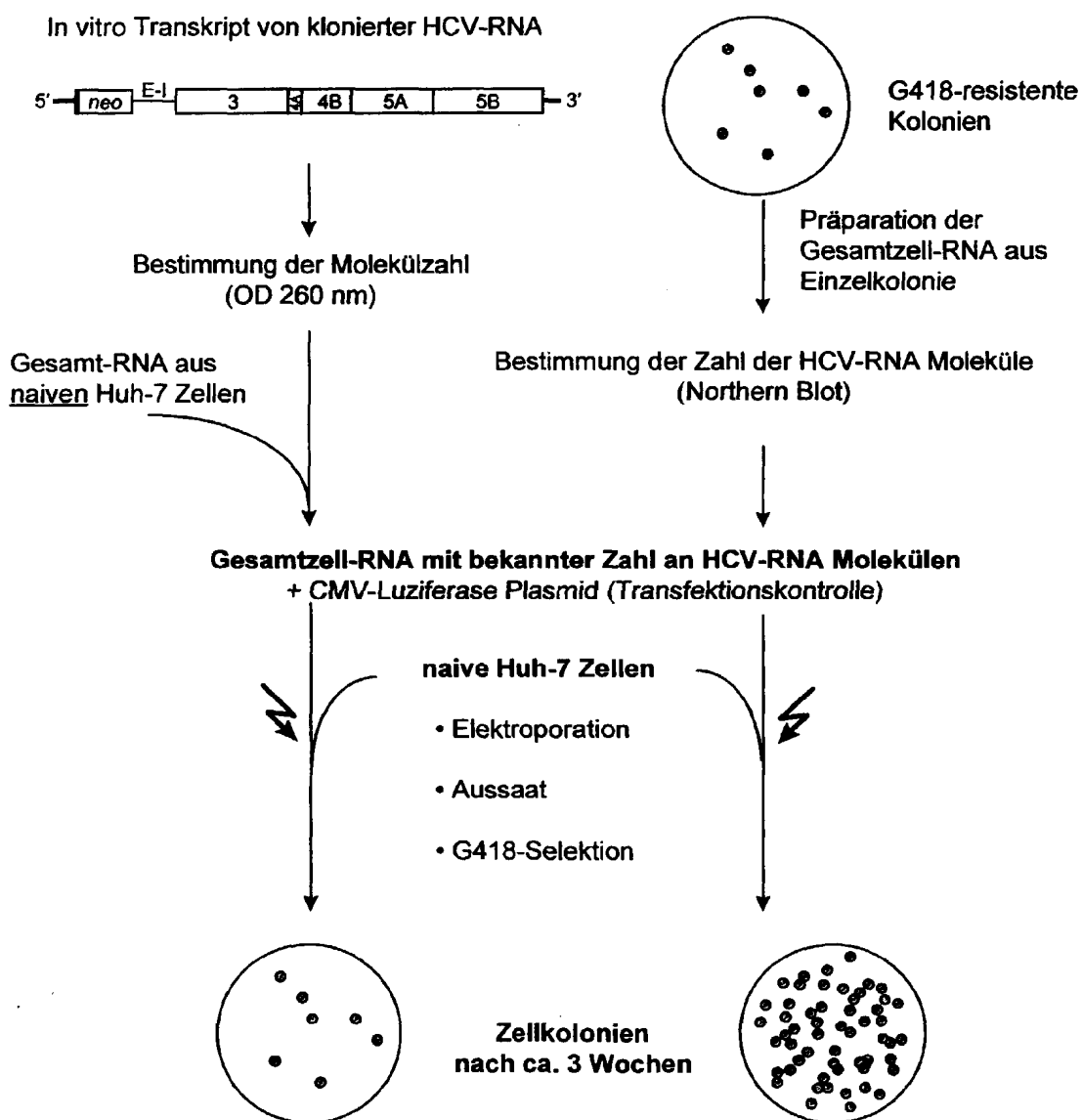


Fig. 9

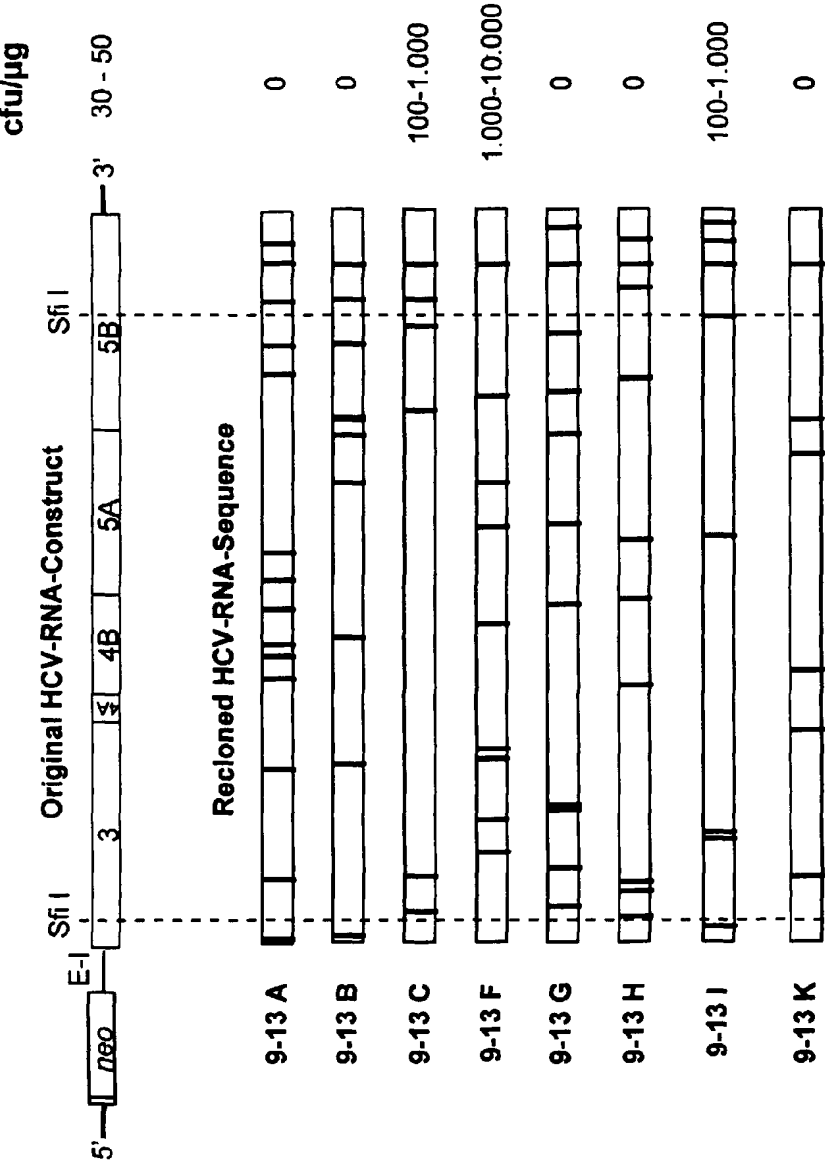


Fig. 10

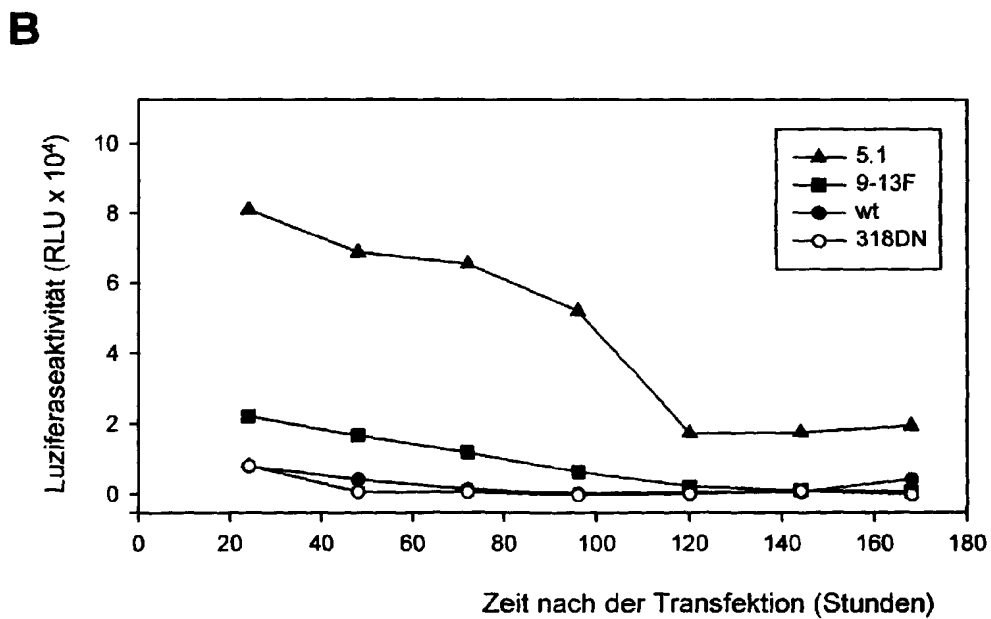
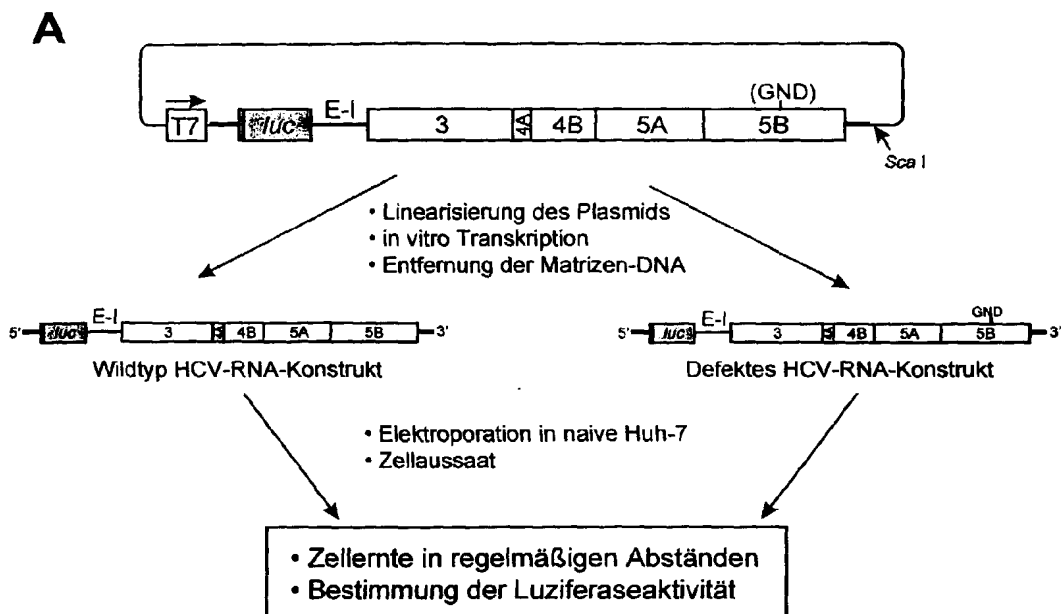


Fig. 11

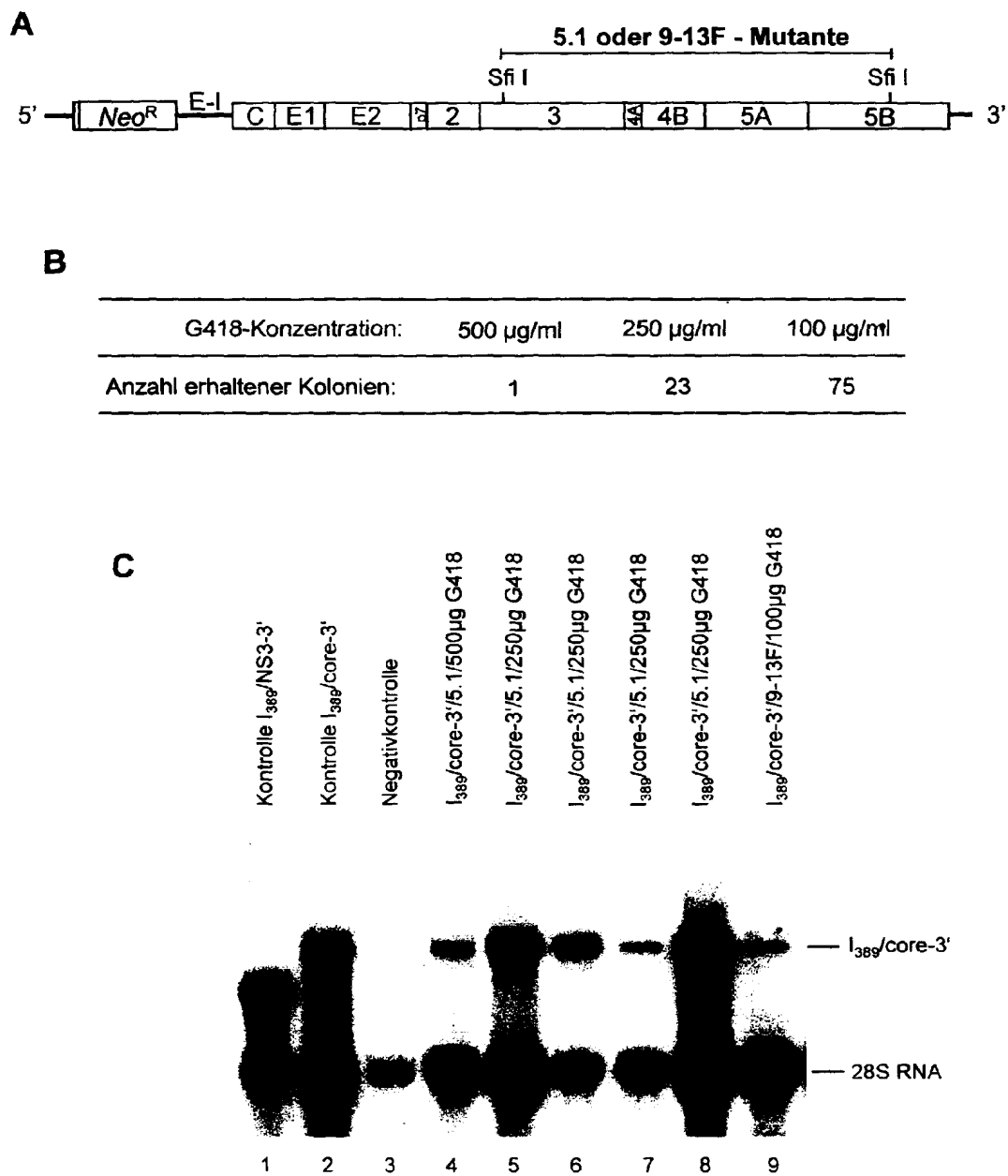


Fig. 12

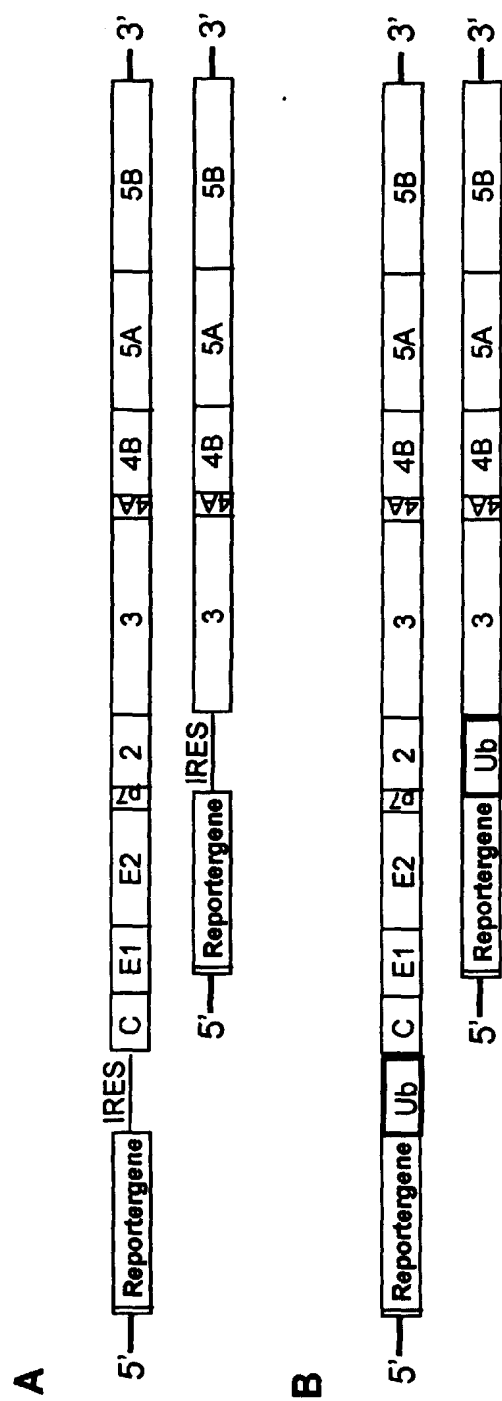


Fig. 13

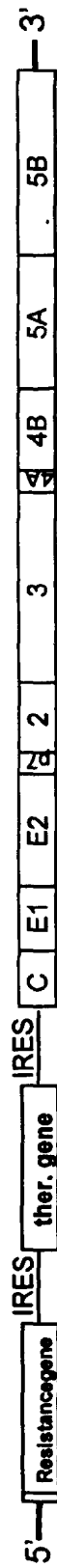


Fig. 14

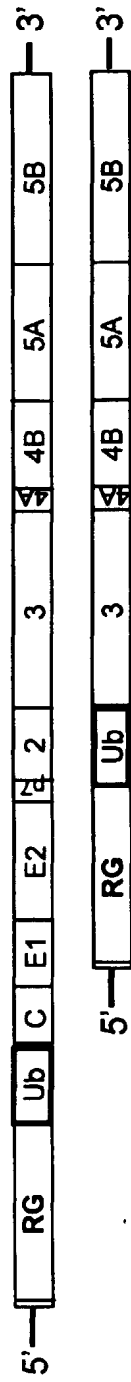


Fig. 15